



**Andreia Daniela Pereira Marinho**  
Licenciada em Química

## **Desenvolvimento e Caracterização de Nanoagentes para a Artrite Reumatoide**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Química Bioorgânica

Orientador: Doutora Teresa Santos Silva, Professora auxiliar, FCT-UNL  
Coorientador: Doutora Cláudia Nunes, Investigadora auxiliar, FFUP

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço  
Arguente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares  
Vogal: Prof. Doutora Teresa Sacadura Santos Silva

**Andreia Daniela Pereira Marinho**

Licenciada em Química

# **Desenvolvimento e Caracterização de Nanoagentes para a Artrite Reumatoide**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Química Bioorgânica

Orientador: Doutora Teresa Santos Silva, Professora auxiliar, FCT-UNL

Coorientador: Doutora Cláudia Nunes, Investigadora auxiliar, FFUP



**Setembro de 2018**



Copyright © - Andreia Daniela Pereira Marinho; Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## AGRADECIMENTOS

---

“A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta. É uma viagem, nunca uma chegada.” Esta frase de Karl Popper acompanhou todo o decorrer deste projeto, tornando-se muitas vezes na força necessária para não baixar os braços quando os resultados teimavam em não surgir.

Foram muitas as pessoas que contribuíram para que o desenvolver e o sucesso deste projeto fosse possível. O sucesso deste trabalho deve-se também a eles, todas as palavras serão poucas para expressar a minha gratidão.

Começo por agradecer aos meus pais e ao meu irmão por estarem sempre presentes, pelo apoio e motivação e porque sem eles nada seria possível! O mais especial de todos os agradecimentos é para eles.

À doutora Teresa Santos Silva, orientadora deste projeto, por toda a ajuda prestada, todas as opiniões e todos os desafios. Por todos os ensinamentos transmitidos, por toda a paciência e por ter permitido que fosse possível o desenvolver do projeto na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

À doutora Cláudia Nunes, coorientadora do projeto, por toda a ajuda, pela paciência, pela motivação, apoio e ensinamentos transmitidos, por acreditar que da próxima vez ia correr melhor, e claro, por ter permitido que fosse possível a minha estadia na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e pela integração no grupo de investigação da qual faz parte.

À doutora Sofia Costa Lima, por toda a ajuda com os ensaios celulares, por sempre se mostrar disponível a transmitir todos os ensinamentos necessários e por acreditar até ao fim que os bons resultados iam surgir.

Aos “pequenos professores” por todas as ajudas no DLS, nas células e em todas as pequenas coisas que por vezes falhavam. Em especial à Ana Isabel por toda a paciência e todas as ajudas. Um agradecimento especial também à Rita por manter a minha cultura celular quando não me encontrava na faculdade.

A todas as pessoas que integram o MB<sup>2</sup>, obrigada por me receberem de braços abertos, por sempre se mostrarem disponíveis a ajudar e pelos bons momentos. Por fazerem valer a pena ter voltado à cidade Invicta! Ficarei eternamente grata a cada um de vocês.

Ao I3S pela disponibilização das instalações e equipamentos, em particular para a visualização das imagens no TEM.

Aos meus amigos por todos os momentos de descontração, pelo apoio e motivação, pelos ensinamentos e pelo espírito de ajuda. Um obrigada especial à Mónica e à Joana que mesmo estando longe foram quem mais me ouviu quando as coisas não corriam tão bem, obrigada por terem partilhado comigo as vossas experiências.

À Dri por ter partilhado o aconchego do seu lar sempre que me desloquei até Lisboa. Nunca me esquecerei da pessoa bondosa que és. Obrigada por todo o carinho!

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, em particular ao Departamento de Química, por me terem recebido enquanto aluna e por tornarem a realização deste estágio possível.

Sem esquecer, um obrigada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em particular ao Laboratório de Química Aplicada e ao grupo de Biofísica Molecular e Biotecnologia, por me terem recebido de braços abertos e tornarem a parceria entre as duas faculdades possível, contribuindo assim para enriquecer, ainda mais, os meus conhecimentos.

**Obrigada!**



## RESUMO

---

A artrite reumatoide (AR) é uma patologia crónica e incapacitante com grande impacto na qualidade de vida dos doentes. Caracteriza-se pela existência de inflamação nas articulações podendo mesmo levar à destruição do tecido articular. Afeta cerca de 0.5 a 1% da população mundial, verificando-se que tem maior incidência em mulheres do que em homens.

Não é conhecida uma cura para a doença, pelo que é fundamental uma terapia mais eficaz para que se consiga controlar os sintomas e se possível retardar o avanço da doença.

O monóxido de carbono (CO) em tempos visto apenas como um agente tóxico, atualmente é explorado pelas suas capacidades anti-inflamatórias, tendo-se desenvolvido moléculas libertadoras de CO, os CORMs, de modo a tirar partido dos seus efeitos terapêuticos.

Nos últimos anos, a nanotecnologia suscitou um grande interesse na comunidade científica, uma vez que, permite criar sistemas de libertação controlada de fármacos tornando possível ultrapassar alguns dos problemas que se encontram nos fármacos ditos convencionais.

Aliando o facto de a AR ser uma patologia inflamatória, do CO ter propriedades anti-inflamatórias e de ser possível criar sistemas de libertação controlada de fármacos, surge o presente trabalho. Pretende-se assim, desenvolver nanoagentes que permitam a libertação controlada de CO, para serem aplicados no tratamento da AR permitindo atenuar os seus sintomas e reduzir os efeitos colaterais, relativamente aos fármacos já existentes para esta patologia.

Os objetivos englobam: o desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica para a AR, baseada no *design* e otimização de nanopartículas lipídicas incorporando CORMs, que possuam um índice terapêutico mais elevado que os tratamentos convencionais e com efeitos colaterais escassos.

**Palavras-chave:** artrite reumatoide; nanopartículas lipídicas; libertação controlada de fármacos; monóxido de carbono; CORMs





## ABSTRACT

---

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, disabling condition with a major impact on patients' quality of life. It is characterized by the existence of inflammation in the joints and may even lead to destruction of the joint tissue. It affects about 0.5 to 1% of the world's population and is found to have a higher incidence in women than in men.

There is no known cure for the disease, so more effective therapy is essential if symptoms are to be controlled and if possible to slow the spread of the disease.

Carbon monoxide (CO), once seen only as a toxic agent, is now exploited for its anti-inflammatory properties, and CO-releasing molecules, CORMs, have been developed to take advantage of its therapeutic effects.

In recent years, nanotechnology has aroused a great deal of interest in the scientific community as it allows for the creation of controlled drug delivery systems making it possible to overcome some of the problems found in so-called conventional drugs.

Combining the fact that RA is an inflammatory pathology, CO has anti-inflammatory properties and it is possible to create controlled drug delivery systems, our goal is to develop nanoagents that allow the controlled release of CO to be applied in the AR treatment, allowing to attenuate its symptoms and reduce the side effects, in relation to the existing drugs for this pathology.

The objectives include the development of a new therapeutic approach to RA, based on the design and optimization of lipid nanoparticles incorporating CORMs, with a higher therapeutic index than conventional treatments and with less side effects.

**Keywords:** rheumatoid arthritis; lipid nanoparticles; controlled release of drugs; carbon monoxide; CORMs



## ÍNDICE

Agradecimentos.....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Índice de figuras.....	xv
Índice de tabelas.....	xix
Abreviaturas e símbolos.....	xxi
1 Introdução.....	1
1.1 Artrite reumatoide: a doença.....	2
1.1.1 Existe um tratamento ideal? .....	5
1.2 NSAIDs .....	6
1.3 Glucocorticóides .....	7
1.4 DMARDs .....	8
1.4.1 Metotrexato.....	8
1.5 DMARDs biológicos.....	9
1.6 Biossimilares .....	10
1.7 Terapia combinada .....	10
1.8 Monóxido de carbono .....	11
1.8.1 Produção endógena de monóxido de carbono.....	12
1.8.2 Moléculas libertadoras de monóxido de carbono .....	13
1.8.3 Monóxido de carbono e inflamação .....	15
1.9 Libertação controlada de fármacos .....	16
1.10 Nanotecnologia.....	17
1.10.1 Nanopartículas lipídicas .....	20
1.10.2 Nanopartículas lipídicas sólidas .....	20
1.10.3 Transportadores lipídicos nanoestruturados .....	21
1.10.4 Nanopartículas no tratamento da artrite reumatoide .....	22
2 Motivação.....	25
3 Parte experimental e métodos .....	27
3.1 Reagentes e solventes .....	28
3.2 Materiais.....	28

3.3	Equipamentos.....	29
3.4	Síntese .....	29
3.4.1	Síntese do conjugado DPPE-HA .....	29
3.4.2	Síntese das NPs lipídicas.....	31
3.5	Métodos .....	31
3.5.1	Dispersão dinâmica da luz .....	31
3.5.2	Potencial Zeta.....	32
3.5.3	Microscopia eletrônica de transmissão.....	33
3.5.4	Eficiência de encapsulação .....	34
3.5.5	Capacidade de <i>loading</i> .....	34
3.5.6	Estabilidade .....	34
3.5.7	FTIR .....	35
3.5.8	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	35
3.5.9	Ensaio com linha celulares .....	35
3.5.10	Estudos de permeação .....	37
4	Resultados e discussão.....	39
4.1	Caracterização do conjugado DPPE-HA .....	40
4.2	Caracterização das nanopartículas .....	40
4.2.1	Dispersão dinâmica da luz e potencial zeta .....	40
4.2.2	Taxa de encapsulação .....	41
4.2.3	Estabilidade .....	42
4.2.4	TEM.....	44
4.3	Estudos de liberação <i>in vitro</i> .....	45
4.4	Cinética de liberação .....	52
4.5	Ensaio com linhas celulares .....	52
4.5.1	Avaliação da toxicidade.....	52
4.6	Estudos de permeação .....	54
5	Conclusão e perspectivas futuras.....	57
6	Referências bibliográficas.....	61
7	Anexos.....	67
7.1	Esquema de síntese do conjugado DPPE-HA.....	68

7.2	Reta de calibração do CORM-2 .....	69
7.2.1	Taxa de encapsulação .....	69
7.2.2	Ensaio de libertação a pH 7.4.....	69
7.2.3	Ensaio de libertação com FaSSGF.....	70
7.2.4	Ensaio de libertação com FaSSIF .....	70
7.2.5	Ensaio de libertação com FeSSIF .....	71
7.3	Reta de calibração ALF073.....	71
7.3.1	Taxa de encapsulação .....	71
7.3.2	Estudos de libertação <i>in vitro</i> .....	72
7.4	Reta de calibração ALF153.....	73
7.4.1	Taxa de encapsulação .....	73
7.4.2	Estudos de libertação <i>in vitro</i> .....	73
7.5	Reta de calibração ALF157.....	74
7.5.1	Taxa de encapsulação .....	74
7.5.2	Estudos de libertação <i>in vitro</i> .....	75
7.6	Cinética de libertação .....	75



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Representação das principais articulações afetadas pela AR (Adaptado de “ABC of Rheumatology” [4]).	2
<b>Figura 1.2:</b> Representação de uma articulação normal e de uma articulação afetada pela artrite reumatoide.	3
<b>Figura 1.3:</b> Vias bioquímicas no processo de inflamação e pontos alvo dos NSAIDs (adaptado de “Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects” [29]).	6
<b>Figura 1.4:</b> Metotrexato. Representação da estrutura química do MTX.	8
<b>Figura 1.5:</b> Representação de agentes biológicos aprovados para o tratamento da AR (adaptado de “New therapeutic approaches in rheumatoid arthritis” [42]).	9
<b>Figura 1.6:</b> Esquema da degradação do hemo. O hemo é degradado em CO, Fe <sup>2+</sup> e biliverdina IX através de uma reação catalisada pela oxigenase do hemo. Numa etapa posterior, catalisada por biliverdina redutase produz bilirrubina IX (Adaptado de “Carbon Monoxide and Its Controlled: Therapeutic Appliation, Detection, and Development of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs)” [51]).	12
<b>Figura 1.7:</b> Estrutura química de CORMs lipossolúveis e solúveis em água. As estruturas químicas das moléculas transportadoras de CO solúveis em lípidos (CORM-1 e CORM-2) e solúveis em água (CORM-3 e CORM-A1) e suas características resumidas (adaptado de “Carbon mo monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities” [54]).	13
<b>Figura 1.8:</b> Inalação de CO vs. administração de CORMs. Distribuição terapêutica de CO aos tecidos doentes com as suas principais vantagens e desvantagens (adaptado de “Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide” [46]).	14
<b>Figura 1.9:</b> Esquema representativo da atividade terapêutica de diferentes CORMs (adaptado de “Bioorganometallic Chemistry Applications in Drug Discovery, Biocatalysis, and Imaging” [59]).	15
<b>Figura 1.10:</b> Propriedades a serem consideradas para o desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos. (adaptado de “Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery” [69]).	17
<b>Figura 1.11:</b> As propriedades das NPs, como o tamanho e a carga, determinam o seu efeito no organismo. (adaptado de “Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery” [75]). Onde Th1/Th2 = células T auxiliaries tipo 1 e tipo 2 respetivamente.	19
<b>Figura 1.12:</b> Modelos de incorporação de fármacos: solução sólida, invólucro enriquecido com fármaco e núcleo enriquecido com fármaco. (adaptado de “Sustained-release from nanocarriers: a review” [81]).	21
<b>Figura 1.13:</b> Diferença entre a estrutura da matriz lipídica de SLNs e de NLCs (adaptado de “Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities” [81]).	21



<b>Figura 1.14:</b> Diagrama esquemático ilustrativo das diferentes estruturas de NLCs (adaptado de "USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COMO VEÍCULO DE FÁRMACOS" <sup>[72]</sup> ). ....	22
<b>Figura 1.15:</b> Representação da estrutura das NPs desenvolvidas incorporando CORM-2 (adaptado de "Enhanced acute anti-inflammatory effects of CORM-2-loaded nanoparticles via sustained carbon monoxide delivery" <sup>[84]</sup> ). ....	23
<b>Figura 3.1:</b> Representação da estrutura do conjugado DPPE-HA. ....	30
<b>Figura 3.2:</b> Esquema representativo das NPs que se pretende obter. ....	31
<b>Figura 3.3:</b> Esquema representativo da Síntese das NPs lipídicas. ....	31
<b>Figura 3.4:</b> Representação esquemática do potencial zeta (adaptado de Brookhaven Instruments Corporation). ....	33
<b>Figura 3.5:</b> Fórmula utilizada para o cálculo da eficiência de encapsulação. ....	34
<b>Figura 3.6:</b> Fórmula utilizada para o cálculo da capacidade loading. ....	34
<b>Figura 3.7:</b> Estrutura química da resazurina e do seu produto reduzido resofurina (adaptado de "Cell Viability Assays" <sup>[93]</sup> ). ....	36
<b>Figura 3.8:</b> Diagrama típico de uma célula de difusão de Franz. Onde se verifica que a célula é constituída por um compartimento dador e um compartimento recetor e a posição da membrana (adaptado de "A REVIEW ARTICLE: IN VITRO RELEASE TECHNIQUES FOR TOPICAL FORMULATIONS" <sup>[96]</sup> ). ....	37
<b>Figura 4.1:</b> Representação gráfica dos espectros de FTIR dos principais reagentes utilizados na síntese do conjugado DPPE-HA (DPPE e HA) bem como do produto final (A = DPPE, B = HA e C = DPPE-HA). ....	40
<b>Figura 4.2:</b> Representações gráficas referentes aos resultados obtidos para os estudos de estabilidade, para: A – tamanho; B – índice de polidispersão, PDI; C – potencial zeta, ZP; D – percentagem de encapsulação (* p<0.05). ....	43
<b>Figura 4.3:</b> Imagens obtidas por TEM, onde A e B representam formulações placebo, e C e D representam formulações com CORM-2, em ambos os casos as NPs possuíam a superfície funcionalizada com DPPE-HA. ....	44
<b>Figura 4.4:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação in vitro do CORM-2, a pH 7.4, usando uma membrana T1, verificando-se se a taxa de libertação do CORM-2 nas NPs é superior à taxa de libertação do CORM-2 livre. ....	45
<b>Figura 4.5:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação, in vitro, do CORM-2 com irradiação de luz, utilizando as membranas de diálise T1 e T2. ....	46
<b>Figura 4.6:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação in vitro do CORM-2, utilizando NPs com a superfície funcionalizada (com DPPE-HA) e membranas de diálise T1, a pH 7.4. ....	46
<b>Figura 4.7:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação in vitro do CORM-2, utilizando como meio FaSSGF para simular o meio gástrico num estado de jejum (pH 1.6), em CORM-2-NPs a superfície das NPs encontra-se funcionalizada com DPPE-HA. ....	47
<b>Figura 4.8:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação in vitro do CORM-2 utilizando como meio FaSSIF para simular o meio intestinal num estado de jejum (pH 6.5), em CORM-2-NPs a superfície das NPs encontra-se funcionalizada com DPPE-HA. ....	48

<b>Figura 4.9:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação in vitro do CORM-2 utilizando como meio FeSSIF para simular o meio intestinal num estado de alimentado (pH 5.0), em CORM-2-NPs a superfície das NPs encontra-se funcionalizada com DPPE-HA. ....	49
<b>Figura 4.10:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação in vitro do ALF073, utilizando NPs com a superfície funcionalizada e membranas de diálise T1, a pH 7.4.....	50
<b>Figura 4.11:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação in vitro do ALF153, utilizando NPs com a superfície funcionalizada e membranas de diálise T1, a pH 7.4.....	50
<b>Figura 4.12:</b> Representação gráfica dos estudos de libertação in vitro do ALF157, utilizando NPs com a superfície funcionalizada e membranas de diálise T1, a pH 7,4.....	51
<b>Figura 4.13:</b> Representação gráfica da viabilidade celular dos estudos efetuados com a linha celular THP1 ao fim de 6h, usando diferentes concentrações de formulações placebo, onde o placebo 1 representa uma formulação placebo produzida no dia do ensaio e o placebo 2 representa uma formulação placebo antigo (os valores representam a média e o desvio padrão de um n=2). ....	53
<b>Figura 4.14:</b> Representação gráfica da viabilidade celular dos estudos efetuados com a linha celular THP1 ao fim de 6h, usando diferentes concentrações de formulações placebo, onde o placebo 1 representa uma formulação placebo produzida no dia do ensaio e o placebo 2 representa uma formulação placebo antiga (os valores representam a média e o desvio padrão de um n=2). ....	53
<b>Figura 4.15:</b> Representação gráfica dos resultados obtidos através dos estudos de permeação in vitro. Como barreira de permeação foi utilizada pele da orelha de porco, pH 7.4 e uma temperatura de 32°C.....	54
<b>Figura 7.1:</b> Representação do esquema reacional da síntese do conjugado DPPE-HA (adaptado de "Polysaccharide-coated liposomes by posto-insertion of a hyaluronan-lipid conjugate" [86])..	68
<b>Figura 7.2:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação do CORM-2 nas NPs .....	69
<b>Figura 7.3:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, in vitro, para o CORM-2 nas NPs e para o CORM-2 livre, usando como meio de diálise o PBS+2%DMSO (pH 7.4). ....	69
<b>Figura 7.4:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, in vitro, para o CORM-2 nas NPs e para o CORM-2 livre, usando como meio de diálise FaSSGF+2%DMSO (pH 1.6).....	70
<b>Figura 7.5:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, in vitro, para o CORM-2 nas NPs e para o CORM-2 livre, usando como meio de diálise FaSSIF+ 2%DMSO (pH 6.5). ....	70
<b>Figura 7.6:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, in vitro, para o CORM-2 nas NPs e para o CORM-2 livre, usando como meio de diálise FeSSIF+2%DMSO (pH 5.0). ....	71
<b>Figura 7.7:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação do ALF073 nas NPs.....	72

<b>Figura 7.8:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, in vitro, para o ALF073 nas NPs e para o ALF073 livre, usando como meio de diálise o PBS+2%DMSO (pH 7.4). .....	72
<b>Figura 7.9:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação do ALF153 nas NPs.....	73
<b>Figura 7.10:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, in vitro, para o ALF153 nas NPs e para o ALF153 livre, usando como meio de diálise o PBS+2%DMSO (pH 7.4). .....	74
<b>Figura 7.11:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação do ALF157 nas NPs.....	74
<b>Figura 7.12:</b> Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, in vitro, para o ALF157 nas NPs e para o ALF157 livre, usando como meio de diálise o PBS+2%DMSO (pH 7.4). .....	75

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Contraste entre as vantagens e desvantagens da terapia combinada na AR inicial (adaptado de " Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis" <sup>[12]</sup> ). .....	11
<b>Tabela 1.2:</b> Fármacos comerciais em sistemas de nanoveículos (adaptado de "Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market" <sup>[72]</sup> ). .....	18
<b>Tabela 1.3:</b> Lista de vários medicamentos e suas abordagens de entrega para o tratamento eficaz da AR (adaptado de "Application of Liposomes in Treatment of Rheumatoid Arthritis: Quo Vadis" <sup>[82]</sup> ). .....	24
<b>Tabela 3.1:</b> Designação do grau de pureza e marca dos reagentes utilizados. ....	28
<b>Tabela 3.2:</b> Registo do modelo e marca dos materiais utilizados.....	29
<b>Tabela 3.3:</b> Registo do modelo e marca dos equipamentos utilizados .....	29
<b>Tabela 4.1:</b> Dados obtidos na caracterização das nanopartículas lipídicas obtidas, através da técnica de DLS.....	41
<b>Tabela 4.2:</b> Dados por medição indireta de UV-vis para a taxa de encapsulação das formulações de NPs lipídicas obtidas .....	42
<b>Tabela 7.1:</b> Valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das constantes da taxa de libertação (k), para a libertação dos CORMs, de acordo com os modelos estudados. ....	76



## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

<b>Abs</b>	Absorvância
<b>ACR</b>	Colégio Americano da Reumatologia
<b>ADA</b>	Adalimumab
<b>Anti-CCP</b>	Anti peptídeo citrulinado cíclico
<b>AO</b>	Ácido oleico
<b>AR</b>	Artrite reumatoide
<b>ARA</b>	Associação Americana de Reumatologia
<b>bDMARDs</b>	Medicamentos modificadores da artrite reumatoide biológicos
<b>CO</b>	Monóxido de Carbono
<b>COHb</b>	Carboxiemoglobina
<b>CORM-2</b>	Dímero de tricarbonildiclororuténio (II)
<b>CORMs</b>	Moléculas libertadoras de monóxido de carbono
<b>COX-1</b>	Ciclo-oxigenase 1
<b>COX-2</b>	Ciclo-oxigenase 2
<b>DEX</b>	Dexametasona
<b>DLS</b>	Dispersão dinâmica da luz
<b>DMARDs</b>	Medicamentos modificadores da artrite reumatoide
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPPE</b>	1,2-Dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
<b>EDC</b>	Hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
<b>EE</b>	Eficiência de encapsulação
<b>ELS</b>	Dispersão de luz eletroforética
<b>EMA</b>	Agência europeia dos medicamentos
<b>ETA</b>	Etanercept
<b>EULAR</b>	Liga Europeia Contra o Reumatismo
<b>FaSSGF</b>	Fluído gástrico simulado em jejum
<b>FaSSIF</b>	Fluído intestinal simulado em jejum
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FeSSIF</b>	Fluído intestinal simulado num estado alimentado
<b>FR</b>	Fator reumatoide
<b>GCs</b>	Glucocorticóides
<b>GM-CSF</b>	Fator de crescimento de colónias de granulócitos e macrófagos
<b>GMPc</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>GR</b>	Recetor de glucocorticóides
<b>HA</b>	Ácido hialurónico
<b>HLA</b>	Antigénio leucocitário humano
<b>HO-1</b>	Hemo oxigenase-1

<b>HO-2</b>	Hemo oxigenase-2
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferão $\gamma$
<b>IgG1</b>	Imunoglobulina 1
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>LC</b>	Capacidade de <i>loading</i>
<b>LM</b>	Microesfera lipídica
<b>LNPs</b>	Nanopartículas lipídicas
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>MTX</b>	Metotrexato
<b>Myrj S40</b>	Estearato de PEG-40
<b>NHS</b>	N-hidroxissuccinimida
<b>NLC</b>	Transportadores lipídicos nanoestruturados
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NSAIDs</b>	Anti-inflamatórios não esteroides
<b>PBS</b>	Solução de tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	Proteína C reativa
<b>PDI</b>	Índice de polidispersão
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>RES</b>	Sistema reticuloendotelial
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SLN</b>	Nanopartículas lipídicas sólidas
<b>Span 20</b>	Monolaurato de sorbitano
<b>TEM</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>Tween 80</b>	Polisorbato 80
<b>Tween20</b>	Polisorbato 20
<b>VS</b>	Velocidade de sedimentação
<b>ZP</b>	Potencial zeta
<b><math>\lambda</math></b>	Comprimento de onda

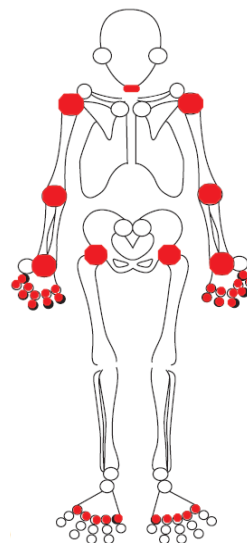
## 1 INTRODUÇÃO

---



## 1.1 ARTRITE REUMATOIDE: A DOENÇA

Classificada como uma doença inflamatória, autoimune, sistêmica, progressiva e crônica, <sup>[1]</sup> a artrite reumatoide (AR) é caracterizada por inflamação simétrica persistente de múltiplas articulações periféricas <sup>[2]</sup> (Figura 1.1), afetando cerca de 0.5 a 1% da população mundial. <sup>[3]</sup> O envolvimento simétrico das mãos, especialmente das articulações metacarpofalangeanas e interfalângicas proximais, com preservação relativa do esqueleto axial, são alguns elementos-chave que auxiliam o diagnóstico desta patologia. <sup>[4]</sup> Em Portugal afeta cerca de 40 mil habitantes. <sup>[5]</sup>



**Figura 1.1:** Representação das principais articulações afetadas pela AR (Adaptado de “ABC of Rheumatology” <sup>[4]</sup>).

No que respeita à apresentação clínica e ao prognóstico é uma doença bastante heterogênea, em alguns pacientes verifica-se que é pouco erosiva e pouco sintomática, enquanto noutros é mais grave e persistente, conduzindo a danos articulares graves e incapacitantes. <sup>[6,7]</sup>

A AR é nitidamente mais frequente no sexo feminino, afetando principalmente pacientes entre a quarta e a sexta décadas de vida. <sup>[3]</sup> Pode conduzir a uma grande morbilidade e o índice de afastamento do trabalho é superior a 60%. <sup>[7]</sup>

A denominação de doença autoimune deve-se à presença de autoanticorpos, tal como o fator reumatoide (FR) e o anti peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) cuja presença pode preceder as manifestações da doença em vários anos. <sup>[8]</sup>

O desenvolvimento desta patologia é multifatorial, existindo, contudo, argumentos a favor da existência de um mecanismo cumulativo de influências genéticas e ambientais. <sup>[9]</sup>

Os fatores genéticos estão ligados a uma série de genes que contêm informações relacionadas com a AR. Esses genes são especialmente aqueles que regulam o complexo principal de histocompatibilidade do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human leukocyte antigen*). Os fatores de risco ambientais associados à AR são principalmente o tabagismo e o álcool, aumentando o risco até quarenta vezes quando comparado com os não expostos. <sup>[10]</sup>

A gravidade da doença, a evolução clínica e as respostas aos tratamentos são muito variáveis. Os sintomas podem desenvolver-se em dias ou evoluir ao longo de muitas semanas ou meses. O progredir da doença pode ser muito rápido ou caracterizado por períodos de remissão parcial ou completa por intervalos de tempo variáveis e não previsíveis. <sup>[11]</sup>

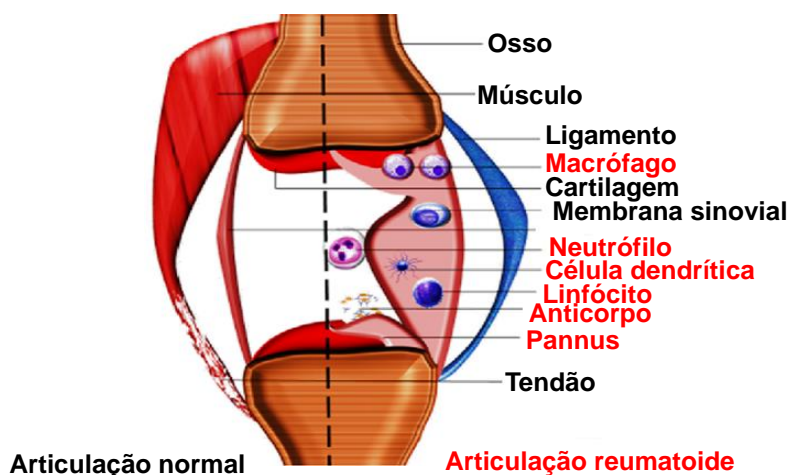
A AR não apresenta um diagnóstico fácil e rápido, devido ao amplo espectro de manifestações, mudanças progressivas do curso da doença e, essencialmente, devido à falta de parâmetros laboratoriais clínicos que sejam característicos da patologia. <sup>[11]</sup>

Em 1956 foram propostos os primeiros critérios de classificação da AR, tendo estes sido aprovados e publicados pela Associação Americana de Reumatologia (ARA) em 1958. <sup>[11]</sup>

Verificando-se que os critérios aprovados pela ARA não eram aplicáveis, em 2010 o Colégio Americano da Reumatologia (ACR) e a Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) propuseram uma nova classificação. <sup>[11]</sup> Estes critérios de avaliação, não foram desenvolvidos para serem usados como diagnóstico, mas podem ajudar a identificar a AR inicial. Entre todos os critérios, destacam-se os seguintes: (1) sintomas persistentes por mais de 2 semanas, (2) características que sugerem AR na artrite inflamatória de início precoce, (3) articulações inchadas, especialmente nas mãos (punho, articulações metacarpaloesféricas, interfalangeais proximais), (4) fator reumatoide positivo, (5) anticorpos anti-CCP positivos, (6) marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa (PCR), elevados, (7) número de articulações inflamadas, (8) padrão simétrico e (9) ausência de um diagnóstico alternativo, como osteoartrite erosiva. <sup>[12]</sup>

Trata-se de uma doença bastante heterogênea tanto no que respeita às manifestações clínicas como no prognóstico. Em alguns pacientes, surge como pouco erosiva e pouco sintomática enquanto noutros, pode ser mais grave e persistente, conduzindo a danos articulares graves e incapacitantes em poucos anos. <sup>[6,7]</sup> Embora as manifestações clínicas variem de indivíduo para indivíduo é frequente a presença de dor crónica e edema, com compromisso articular, frequentemente simétrico, e fadiga. <sup>[13-15]</sup>

A inflamação da membrana sinovial conduz ao seu aumento de espessura, e com o tempo, ocorre destruição de outros tecidos das articulações, <sup>[16]</sup> destruição agressiva das cartilagens e erosões ósseas progressivas (Figura 1.2). <sup>[2]</sup> Com a progressão da doença, a dor, a destruição articular e a perda de movimentos podem comprometer a qualidade de vida do indivíduo. <sup>[16]</sup>



**Figura 1.2:** Representação de uma articulação normal e de uma articulação afetada pela artrite reumatoide.

No que respeita às manifestações a nível articular, as mãos são afetadas em quase todos os pacientes, verificando-se uma fase mais inicial em que as articulações do punho e mão são as mais afetadas, <sup>[17,18]</sup> com o progredir da AR as articulações do cotovelo, joelho, ancas e ombro são habitualmente afetadas. <sup>[14,17,19,20]</sup>

Analicamente, a AR caracteriza-se tanto por uma elevada velocidade de sedimentação (VS) como por um aumento da PCR, anemia normocrômica, trombocitose, número de leucócitos normal ou ligeiramente elevado, mas com contagem diferencial normal e deteção de FR séricos

em 60 a 70% dos doentes. <sup>[9]</sup> A detecção dos anticorpos anti-CCP oferece uma especificidade superior à do FR no diagnóstico da AR. A pesquisa simultânea dos dois fatores revela uma maior exatidão no diagnóstico. <sup>[21]</sup> Ao nível do hemograma as alterações são variáveis, contudo, a contagem de plaquetas está normalmente aumentada e a contagem de leucócitos pode também apresentar valores acima da referência. <sup>[11]</sup>

Nesta doença, ocorre ativação anormal dos linfócitos B, T e dos efetores imunes inatos. <sup>[22]</sup> A origem exata do problema é ainda desconhecida. Por esse motivo, não existe atualmente um tratamento para a AR, mas existem opções terapêuticas que controlam os sinais da doença e que são capazes de diminuir a atividade da mesma. <sup>[22]</sup>

O evento inicial da doença é o processo inflamatório na membrana sinovial (sinovite) com infiltrado de linfócitos e macrófagos. <sup>[23]</sup> Subjacente ao processo inflamatório está a migração de células sanguíneas e de mediadores inflamatórios para o interior das articulações, resultando em hiperplasia sinovial e das células linfóides. <sup>[24]</sup> Os infiltrados inflamatórios segregam grandes quantidades de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), interleucina-1 (IL-1), IL-6, quimiocinas e proteases. Este conjunto de fatores leva a que os macrófagos e os fibroblastos que se encontram no revestimento sinovial segreguem citocinas inflamatórias e proteases adicionais. O resultado é uma membrana sinovial inflamada e invasiva, o *pannus*. <sup>[22]</sup>

As erosões ósseas são um processo irreversível que ocorrem precocemente na AR. Aqui, o equilíbrio entre a reabsorção e a formação ósseas está alterado, verificando-se um aumento na reabsorção. Esta reabsorção é mediada por células que existem em grande quantidade no *pannus* sinovial da articulação afetada. <sup>[24]</sup>

A formação de novos vasos sanguíneos é essencial no processo de proliferação sinovial e a posterior formação do *pannus*. Estes vasos sanguíneos acompanham a hipertrofia sinovial e permitem o fluxo de células inflamatórias ao interior da articulação, facilitando a progressão do processo inflamatório. <sup>[24]</sup>

Várias citocinas pró-inflamatórias estão associadas à inflamação e à proliferação da membrana sinovial, nomeadamente, IL-1, IL-6, IL-8, TNF e o fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), assim como, várias citocinas anti-inflamatórias, designadamente a IL-4, IL-13 e a IL-10. Em conjunto, todas elas promovem o processo inflamatório e a destruição articular e tecidual. <sup>[24]</sup>

As erosões ósseas decorrem da chamada área nua na junção entre a cartilagem, membrana sinovial e osso. A cartilagem sofre danos devido a efeitos catabólicos em condrócitos após a sua estimulação por citocinas. <sup>[25]</sup>

Os sintomas da AR manifestam-se sobretudo ao nível das articulações, sob a forma de dor, inflamação, rubor, tumefação, rigidez matinal e dificuldade na mobilização. <sup>[22]</sup> Apesar disso, trata-se de uma doença sistémica, podendo por isso, apresentar sintomas extra-articulares. As manifestações extra-articulares mais comuns são os nódulos reumatoides, formações nodulares subcutâneas, localizadas em áreas de pressão, como os cotovelos, articulações dos dedos, proeminências isquiáticas e sagradas, occipitais e tendões de Aquiles. Podem ainda surgir outros

problemas sistêmicos como, a fibrose pulmonar, derrame pleural, pericardite, vasculite, miosite e vários tipos de envelhecimento do sistema nervoso, sobretudo devido a processos compressivos. [9,22]

### 1.1.1 Existe um tratamento ideal?

Até aos anos de 1990, o diagnóstico da AR tinha consequências devastadoras. O tratamento desenrolava-se como uma pirâmide de acontecimentos. Primeiramente, começava-se com repouso e apenas quando se verificava progressão da doença utilizava-se a terapia com anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs, do inglês *NonSteroidal Anti-Inflammatory Drugs*) e agentes antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs, do inglês *Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs*). [12] No entanto, a constatação de que a progressão radiográfica e o dano articular ocorrem com frequência durante fases iniciais da doença, levou a abordagens mais agressivas de tratamento, incluindo o uso imediato de DMARDs no diagnóstico e/ou o uso combinado de múltiplos agentes. [26] Nos dias de hoje, o objetivo do tratamento, em qualquer estado da doença, é alcançar a remissão ou a baixa atividade da doença se a remissão não for possível. [12]

Com a evolução das estratégias terapêuticas para a AR, acredita-se que uma terapêutica agressiva e precoce poderá reduzir a incapacidade, morbilidade e mortalidade dos doentes. [9] De modo a chegar a este tratamento ideal, nos decorrer dos últimos anos têm sido efetuados vários estudos, onde se procura comparar a eficácia das várias terapêuticas já existentes e suas combinações, assim como, desenvolver terapêuticas que sejam mais eficientes.

Pela natureza multifacetada da AR, não existe um tratamento que possa curar definitivamente esta doença. Contudo, existem no mercado tratamentos que ajudam a melhorar a qualidade de vida dos doentes, reduzindo os sinais e sintomas deste problema. [22]

Sendo a inflamação a maior manifestação na AR, a sua reversão é o principal alvo terapêutico. Se se conseguir diminuir a inflamação rapidamente, o dano ou a sua progressão são prevenidos, e a função física pode ser melhorada, sem aumento do número de sequelas. O tratamento desta patologia exige então uma abordagem estratégica, pela qual a avaliação da doença conduz a alterações terapêuticas ou a alterações de fármacos de acordo com a atividade da doença. [25]

#### 1.1.1.1 Tratamento não farmacológico – fisioterapia e cirurgia

Deve considerar-se a realização de fisioterapia no plano de reabilitação, tendo em conta as articulações afetadas e a fase da doença em que o paciente se encontra. Pretende-se com esta técnica fortalecer os músculos e treinar as atividades da vida quotidiana, sendo possível recorrer a instrumentos que podem auxiliar a realização dessas tarefas (por exemplo, adaptadores para a escova dos dentes). [27]

Após se discutir a possibilidade de recorrer à cirurgia com o reumatologista, deve recorrer-se ao conhecimento de um cirurgião ortopédico ou neurocirurgião com interesse na AR de modo a encontrar a solução mais indicada para o paciente. [27]

### 1.1.1.2 Tratamento farmacológico

Os tratamentos atualmente disponíveis no mercado melhoram a capacidade de executar as atividades diárias e o bem-estar dos doentes, por meio da redução da inflamação, alívio da dor e redução dos danos articulares. [28]

Este tipo de tratamento tem por base anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), analgésicos, glucocorticoides (GCs) e agentes antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs). Com o decorrer dos anos o conhecimento sobre a fisiopatologia da AR permitiu que as células e moléculas com maior importância na doença fossem identificadas, o que levou ao desenvolvimento de novas terapêuticas biológicas (DMARDs biológicos ou bDMARDs). [27,28]

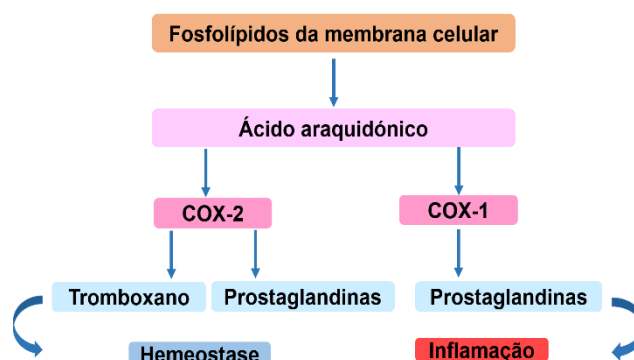
## 1.2 NSAIDs

Os anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs) são um grupo de moléculas heterógenas com várias classes estruturais e perfis benefício/risco variáveis, que não incluem o núcleo de esteroides na sua estrutura. [29]

O objetivo dos NSAIDs é reduzir a dor, a rigidez e melhorar a função. [10] Normalmente, este tipo de fármacos é usado temporariamente até que os DMARDs entrem em utilização, assim como, durante os surtos da doença. [30]

Estes fármacos não modificam o progresso da doença e têm sido várias as recomendações no sentido de minimizar o uso destes devido à toxicidade associada. [11] Os NSAIDs de “curta duração” mais comuns, incluem o Ibuprofeno, Diclofenac, Cetoprofeno e Indometacina. Como exemplo de NSAIDs de longa duração destacam-se o Naproxeno, Celecoxibe, Meloxicam, Nabumetona e Piroxicam. [31]

Em 1971 soube-se que o mecanismo bioquímico de ação dos NSAIDs se deve à inibição das ciclo-oxigenase 1 e 2, COX-1 e COX-2 respetivamente (Figura 1.3). [29,30] A inibição das COX-2 pelos NSAIDs bloqueia a produção de prostaglandinas nos locais de inflamação, enquanto a inibição da COX-1 noutros tecidos – plaquetas e mucosa gastroduodenal principalmente – pode



**Figura 1.3:** Vias bioquímicas no processo de inflamação e pontos alvo dos NSAIDs (adaptado de "Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects" [29]).

levar a efeitos colaterais comuns nos NSAIDs com o sangramento e ulceração gastrointestinal. [32]

Os NSAIDs geralmente são agrupados de acordo com as suas estruturas químicas, tempo de sem-ivida, e de acordo com a ciclo-oxigenase que inibem. Embora os NSAIDs ditos tradicionais, bloqueiem as duas isoformas da ciclo-oxigenase. [32]

De acordo com as recomendações das entidades reguladoras, deve ser prescrita a dose mais baixa de NSAIDs que seja compatível com o alívio dos sintomas. Assim que for obtida uma boa resposta à terapia com DMARDs, esta dose deve ser reduzida ou mesmo suspensa. [30]

### 1.3 GLUCOCORTICÓIDES

Os glucocorticoides (GCs) são hormonas do *stress* oxidativo essenciais que se difundem livremente através da membrana e se ligam ao recetor de glucocorticóides, GR (do inglês, *glucocorticoid receptor*), e desempenham um papel em diferentes processos fundamentais, tais como, hemóstase metabólica, cognição, proliferação celular, desenvolvimento, reprodução e inflamação. [32,33]

O complexo GC/recetor liga-se reversivelmente a um promotor de *DNA* específico ou a locais supressores no núcleo, resultando na produção ou inibição da transcrição de proteínas anti-inflamatórias. A lipocortina é uma das principais proteínas para as quais a produção é regulada pelos GCs. Os efeitos anti-inflamatórios desta proteína são mediados pela inibição da fosfolipase A2, que converte os fosfolípidos ligados à membrana em ácido araquidónico, com subsequente produção intracelular de prostaglandinas, leucotrienos e radicais de oxigénio. [33]

Ao estimularem a produção de lipocortina, os GCs também inibem a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-2, IL-3, interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e TNF. Estimulam também a produção de uma proteína que controla o gene da COX-2 e regula negativamente a ativação da COX-2 em células inflamatórias. [33]

Devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, os GCs estão entre os medicamentos mais amplamente prescritos em vários distúrbios autoimunes, inflamatórios e alérgicos. [34] Na AR, os GCs são frequentemente inseridos no regime de tratamento por um curto período de tempo, como meio de minimizar a atividade da doença enquanto se aguarda que a terapia com DMARDs surta efeito. [30]

O uso terapêutico desta classe de fármacos é limitado por uma ampla gama de efeitos colaterais sérios que lhes estão associados. [25] O uso de glucocorticóides por longos períodos de tempo podem causar alterações no metabolismo da glicose, imunossupressão generalizada, doenças cardiovasculares, entre outros problemas. As terapias baseadas no uso de imunossupressores possuem graves efeitos colaterais que compreendem imunossupressão generalizada, hipertensão, dor de cabeça, insuficiência renal, entre outros. [35]

## 1.4 DMARDs

Os fármacos antirreumáticos modificadores da doença, (DMARDs) tornaram-se a base do tratamento da AR na década de 1970. [36] A aplicação deste tipo de fármacos sofreu alterações nas últimas décadas, o que proporciona uma terapêutica mais eficaz desta patologia. [11]

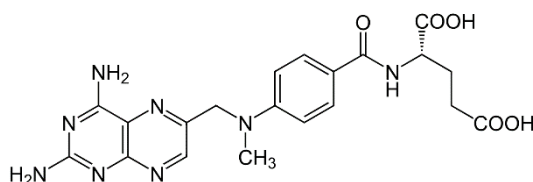
Estes fármacos mostraram diminuir a inflamação e retardar a progressão radiográfica. Contudo, o grau em que isso acontece é variável. [37]

Vários estudos têm mostrado que o tratamento combinado entre DMARDs é superior ao seu uso em monoterapia na diminuição da progressão radiológica e na supressão da atividade da doença. [7]

A base da terapia com DMARDs é o metotrexato (MTX), o seu uso mostrou benefícios sustentados para pelo menos 50% dos pacientes com AR que o recebem. [93] Existem outros DMARDs, como a Sulfassalazina, a Hidroxicloroquina e a Leflunomida que são usualmente utilizados como substitutos ou em combinação com o MTX. [38] Neste contexto, apenas o MTX será focado.

### 1.4.1 Metotrexato

Análogo do ácido fólico, o MTX (figura 1.4), é um inibidor da diidrofolato redutase. [24] Ao inibir esta enzima o MTX reduz o suprimento de purinas e pirimidinas nas células que proliferam rapidamente, o que interfere na síntese do DNA. [38] Trata-se de um DMARD não biológico aprovado para o tratamento da AR desde 1990, considerando-se a sua terapia como *standard*. [24]



**Figura 1.4:** Metotrexato. Representação da estrutura química do MTX.

A terapia com MTX é suficiente para cerca de 1/3 dos pacientes com AR. [37] Vários estudos mostram que fármacos anti TNF têm uma maior eficácia quando combinados com o MTX, motivo pelo qual se considera o MTX como fármaco âncora, contudo, o seu mecanismo de ação combinado não é ainda conhecido. [24]

Apesar da sua vasta utilização, o seu uso está associado a várias toxicidades, em cerca de 40% dos pacientes tratados com MTX são observados efeitos adversos ao nível gastrointestinal, como náuseas, vômitos, úlceras e diarreia, podendo também ocorrer hepatotoxicidade. [40] Em alguns casos verifica-se também a ocorrência de infeções graves ou insuficiência respiratória. A incidência e a gravidade dos efeitos adversos durante a terapia estão

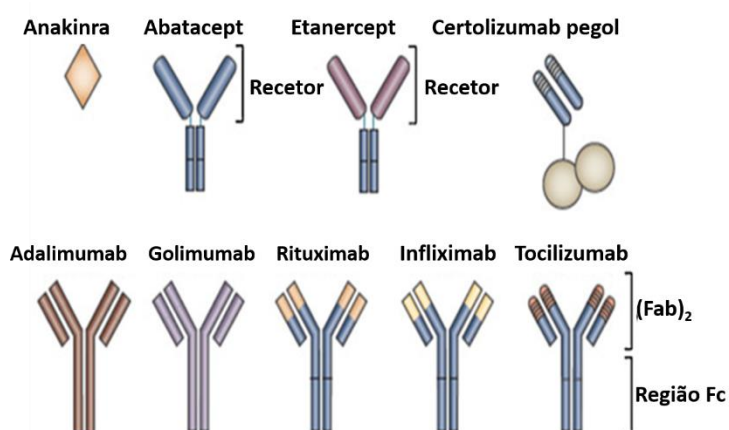
relacionados à dose e frequência de administração necessárias para se obter um efeito terapêutico. [41]

## 1.5 DMARDs BIOLÓGICOS

Os DMARDs biológicos (Figura 1.5) são moléculas que modulam as proteínas da inflamação, demonstrando eficácia no tratamento da patologia, nomeadamente em paciente que são resistentes ao MTX. [27] Esta classe inclui antagonistas de citocinas, agentes de depleção de células B, moduladores de co-estimulação de células T e inibidores de quinase. [38,42]

Devido ao seu custo e perfil de efeitos colaterais, o uso de bDMARDs é normalmente recomendado após os pacientes terem falhado o uso com DMARDs convencionais em monoterapia ou em terapia combinada. No entanto, em pacientes que apresentem doença erosiva altamente agressiva eles podem ser considerados como um componente da terapia de primeira linha. [37]

O desenvolvimento dos agentes biológicos oferece opções terapêuticas mais seguras, mais efetivas, porém mais caras que o uso dos DMARDs convencionais. [26] A escolha inicial de um DMARD biológico é tipicamente um agente bloqueador do fator de necrose tumoral. [37]



**Figura 1.5:** Representação de agentes biológicos aprovados para o tratamento da AR (adaptado de "New therapeutic approaches in rheumatoid arthritis" [42]).

O TNF é uma citocina pró-inflamatória que é um mediador central na cascata inflamatória normal. Ao bloquear os recetores do TNF, a inflamação é reduzida às custas do sistema imunológico estar suprimido. Subjacente a este efeito imunossupressor está o risco de infeções graves. [39]

Dentro dos medicamentos biológicos, os inibidores do TNF em combinação com o MTX mostram uma grande eficácia em pacientes quando a terapia é iniciada no início do curso da doença. Apesar disto, vários problemas estão associados ao uso dos medicamentos biológicos atuais, como por exemplo, altos custos e riscos de infeções bacterianas graves. [38]

Terapias baseadas em anticorpos monoclonais, como anti TNF, têm várias desvantagens: imunogenicidade do anticorpo tornando as terapias subsequentes ineficazes; reativação da



tuberculose, toxicidade hepática e medular e suscetibilidade a doenças infecciosas; e heterogeneidade na eficácia terapêutica. [35]

## 1.6 BIOSSIMILARES

Um biossimilar é definido pela FDA (*Food and Drug Administration*) do seguinte modo: “produto biológico aprovado com base na demonstração de que é altamente similar a um produto biológico aprovado pela FDA, conhecido como produto de referência, e não possui diferenças clinicamente significativas em termos de segurança e eficácia do produto de referência. Apenas pequenas diferenças em componentes clinicamente inativos são permitidas em produtos biossimilares”. [43]

De uma maneira mais simples um biossimilar é uma cópia oficialmente aprovada de uma terapia biológica original. O processo de aprovação do biossimilar exige demonstração da comparabilidade em qualidade, eficácia e segurança entre este e o medicamento que lhe deu origem. [44]

O primeiro biossimilar, Somotropina, foi aprovado em 2006 pela EMA (Agência Europeia dos medicamentos, do inglês *European Medicines Agency*). No início de 2015 foram aprovados na Europa 20 biossimilares. [44]

O objetivo fundamental do desenvolvimento dos biossimilares é melhorar os resultados dos pacientes, garantindo produtos biológicos com melhor acessibilidade. [44]

Em alguns países, o biossimilar de Infliximab já foi introduzido para tratar condições reumáticas. No que respeita a outros biossimilares, por exemplo, Adalimumab e Etanercept, já estão a ser efetuados estudos. No caso particular do Rituximab, vários biossimilares já se encontram num estágio avançado de desenvolvimento, estando alguns já em fase de ensaios clínicos em pacientes com AR. [44]

## 1.7 TERAPIA COMBINADA

Estudos clínicos realizados nos últimos anos demonstram que abordagens de tratamento mais agressiva usando agentes biológicos em combinação com DMARDs, especialmente com o MTX, proporcionam benefícios significativamente maiores no controle da progressão da doença quando comparado com a monoterapia com DMARDs ou bDMARDs. [26] A tabela 1.1 mostra as vantagens e desvantagens da utilização da terapia combinada.

**Tabela 1.1:** Contraste entre as vantagens e desvantagens da terapia combinada na AR inicial (adaptado de " *Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis*" <sup>[12]</sup>).

Vantagens	Desvantagens
→ A rápida remissão será alcançada mais rapidamente por um número crescente de pacientes	→ Mais caro (especialmente, bDMARDs)
→ Remissão mais rápida pode resultar em benefícios a longo prazo (ou seja, menos danos nas articulações, maior chance de reduzir a terapia no futuro)	→ Nem todos os pacientes precisam de terapia combinada
	→ Menor aceitação do paciente (comparado com a monoterapia)
	→ Mais tempo na clínica

Pacientes que usam produtos biológicos em associação com o MTX podem ter melhores respostas e durabilidade de tratamento quando comparados com doentes que usam apenas bDMARDs. <sup>[12]</sup>

O estudo ATTRACT, mostra isso mesmo, a utilização de MTX em combinação com Infliximab, demonstrou eficácia clínica, com melhoria dos sinais e sintomas em doentes com AR e diminuiu a progressão radiológica. <sup>[24]</sup>

## 1.8 MONÓXIDO DE CARBONO

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor e ubíquo a temperaturas acima dos -190°C. A maior parte do CO no corpo (80%) está ligado à hemoglobina como carboxiemoglobina (COHb) e os restantes 20% encontram-se distribuído pelos tecidos. As concentrações celulares de CO dependem das pressões parciais locais de CO e O<sub>2</sub>, uma vez que, os dois gases competem pelos mesmos locais de ligação de iões de ferro ou cobre. <sup>[45]</sup>

À primeira vista, a conhecida toxicidade letal do CO parece ser incompatível com um papel terapêutico para esta molécula. <sup>[46]</sup> Quando se ouve que o CO pode ser usado para tratar doenças, surge a questão de como é que isso pode ser possível, dada a intensa propaganda sobre o perigo de inalar este gás potencialmente tóxico. <sup>[47]</sup> Foram 3 as descobertas que determinaram que o CO é um gás biológico importante: (1) a descoberta de que o CO é produzido endogenamente no Homem e que a quantidade de CO emitida é maior em pacientes que sofrem uma de uma variedade de doenças do que em humanos saudáveis; (2) o metabolismo oxidativo do hemo é fonte de CO nos seres humanos; (3) as duas enzimas metabólicas geradoras de CO, hemo oxigenase 1 e 2 (HO-1 e HO-2, respetivamente, derivado do inglês, *hemo oxygenase*) foram isoladas e caracterizadas. <sup>[46]</sup>

Por si só, o CO é um paradigma. Vários avanços mostraram o efeito maléfico do CO. <sup>[48]</sup> Por outro lado, a descoberta de que o CO pode ter benefícios poderosos e efeitos curativos não

só mudaram a forma como vemos o CO, mas, com enorme contradição, resultaram em ensaios clínicos para testar a capacidade do CO no tratamento de várias patologias. [47]

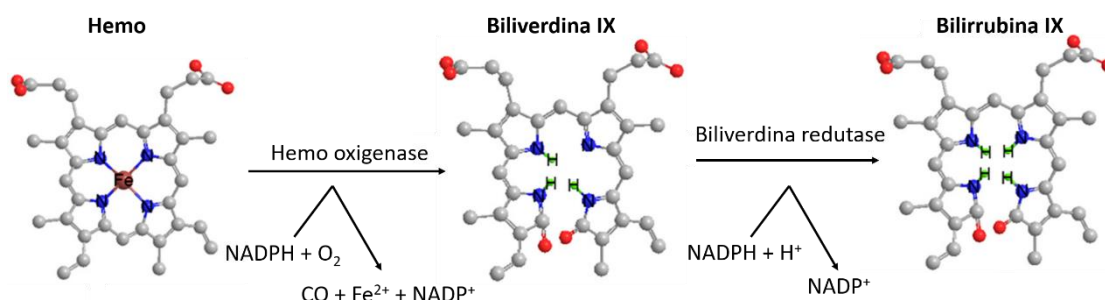
Embora o CO seja um potencial agente anti-inflamatório, o facto de ser um gás causa várias limitações no uso clínico. A terapia com gás requer um controle de dose contínuo, juntamente com condições hospitalares especiais. [49] O desafio, passa então, pelo desenvolvimento de métodos seguros e convenientes para a entrega de quantidades terapêuticas de CO. [46]

### 1.8.1 Produção endógena de monóxido de carbono

Em 1850 reconheceu-se que a ligação do CO à hemoglobina poderia ser reversível, culminando numa reação química potente que poderia causar asfixia. É em 1950 que se descobrem evidências experimentais reais para a existência de CO no organismo humano. Observou-se que a decomposição *in vivo* da hemoglobina produzia CO. [48] A taxa de produção de CO num organismo humano é de 20  $\mu\text{mol/h}$ . [50]

Além da absorção do gás exógeno, as células e os tecidos produzem quantidades significativas de CO como um produto de eliminação do metabolismo celular em grande parte da degradação do hemo. [50]

Durante a degradação do hemo é catalisada pelas enzimas HO-1 e HO-2 e na presença de cofatores NADPH e de  $\text{O}_2$ . De forma rigidamente controlada, o anel de porfirina IX do hemo colapsa na presença de cofatores NADP e  $\text{O}_2$  para produzir CO e  $\text{Fe}^{2+}$ , biliverdina IX e bilirrubina IX (Figura 1.6). [51]



**Figura 1.6:** Esquema da degradação do hemo. O hemo é degradado em CO,  $\text{Fe}^{2+}$  e biliverdina IX através de uma reação catalisada pela oxigenase do hemo. Numa etapa posterior, catalisada por biliverdina redutase produz bilirrubina IX (Adaptado de "Carbon Monoxide and Its Controlled: Therapeutic Appliation, Detection, and Development of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs)" [51]).

A produção de CO está associada a uma variedade de papéis fisiológicos, como efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anticoagulantes, e aplicações terapêuticas, como a redução da rejeição de enxertos de órgãos e proteção contra lesão por isquemia e reperfusão. Por outro lado, a falta de produção de CO está associada a vários estados de doença, incluindo diabetes e inflamação vascular. [52]

Apesar de já começar a existir literatura a descrever as importâncias biológicas do CO, os mecanismos químicos pelos quais o CO regula esses processos biológicos são ainda pouco compreendidos. [52]

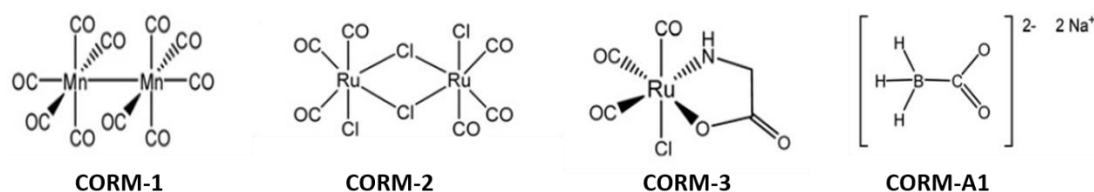
## 1.8.2 Moléculas libertadoras de monóxido de carbono

Uma vez descobertas as propriedades benéficas dos CO foi necessário desenvolver formas de o administrar sem riscos para a saúde. Até ao momento, foram utilizadas 3 formas distintas administração. A forma mais simples trata-se da administração de CO gasoso em baixas concentrações. O segundo método envolve a utilização de soluções fisiológicas saturadas com CO, que embora seja aplicável em cenários de transplantes, teriam uma aplicação limitada como agente terapêutico; a última forma, é recorrer a agentes químicos que tenham capacidade de libertar esta molécula. Estes agentes químicos incluem as moléculas libertadoras de CO (CORMs, do inglês *carbon monoxide releasing molecules*). [50]

Os CORMs são pró-fármacos farmacologicamente competentes que transportam e libertam CO como princípio ativo. [46, 53] CORMs são destinados a fornecer quantidades controladas de CO para tecidos e órgãos. [7]

A ideia de desenvolver compostos capazes de transportar e entregar CO para sistemas biológicos teve origem no final da década de 1990 quando a evidência emergente apontou a via HO-1/CO como fator crucial na resolução de vários estados patológicos. As estruturas químicas dos primeiros CORMs encontram-se representadas na figura 1.7. [7,54]

Uma vez que o CO é conhecido por se ligar fortemente aos metais de transição em solventes orgânicos, pensou-se que um processo reversível poderia ser usado para desencadear a libertação desse gás a partir dessas “formas sólidas” arquetípicas de CO. [7]



**Figura 1.7:** Estrutura química de CORMs lipossolúveis e solúveis em água. As estruturas químicas das moléculas transportadoras de CO solúveis em lípidos (CORM-1 e CORM-2) e solúveis em água (CORM-3 e CORM-A1) e suas características resumidas (adaptado de “Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities” [54]).

Muito poucos agentes farmacêuticos são compostos organometálicos, em grande parte devido à reatividade dos metais com substâncias biológicas (por exemplo, cadeias laterais de proteínas nucleofílicas e eletrofílicas) e à toxicidade de muitos metais pesados. [46] A toxicidade associada ao metal é então considerada o tendão de Aquiles desta tecnologia, devida aos desafios de segurança quando estes pró-fármacos são aplicados no Homem. [55] No entanto, o CO libertado através dos CORMs pode ser administrado com precisão em determinadas concentrações por todas as vias possíveis de administração, contrariamente ao CO gasoso, que

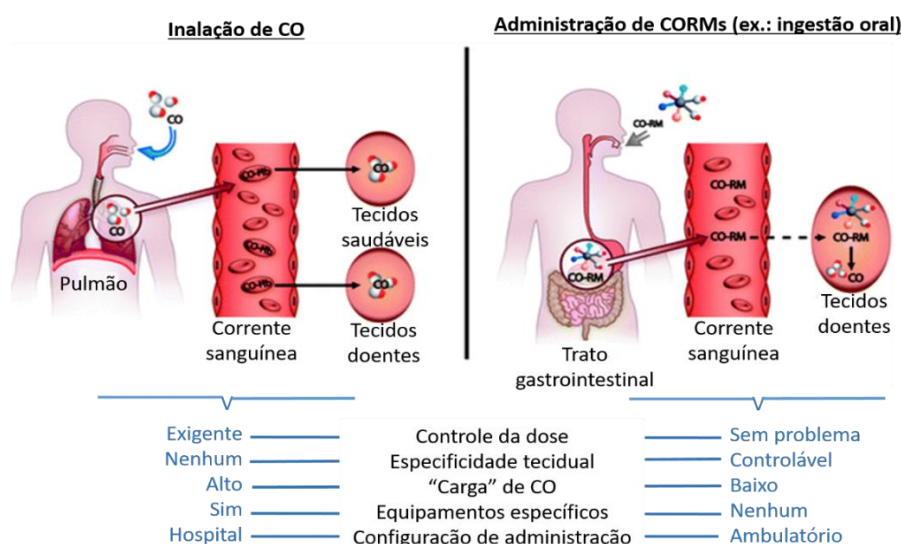
apenas pode ser administrado por inalação. Torna-se evidente que as concentrações de COHb não aumentam para níveis de risco quando se usam CORMs em doses que são farmacologicamente eficazes. [56]

Sendo os CORMs uma classe de fármacos capazes de exercer efeitos anti-inflamatórios, têm-se efetuado diversos estudos para mostrar essa propriedade. [57]

A libertação do CO através dos CORMs pode ser iniciada por diversos modos. Um mecanismo possível é a ativação externa fotoquímica, sendo estes CORMs chamados de *PhotoCORMs*, como é o caso do CORM-1 por exemplo. O CORM-2, por outro lado, liberta o CO espontaneamente através da substituição de ligandos, formando uma nova ligação com, por exemplo, o enxofre. Existem ainda CORMs que libertam o CO pela combinação de vários mecanismos, como por exemplo o CORM-3, que liberta o CO pela degradação térmica e substituição de ligando. [57]

Este tipo de complexos metálicos estão associados a problemas de citotoxicidade e estabilidade quando se encontram em soluções, além de que a sua libertação para alvos específicos e a semi-vida adequada de libertação do CO são também parâmetros essenciais quando se pensa em aplicações terapêuticas. A realidade é que alguns CORMs apresentam tempos de semi-vida muito reduzidos. O tempo de semi-vida do CORM-3 em plasma humano é de 3.6 minutos, e para os CORM-1, -2 e -3 em tampão PBS a 37°C e pH 7.4 é de 1 minuto. Tendo em conta que os CORMs têm que circular nos fluidos corporais para alcançar o tecido/órgãos alvo antes de o CO ser libertado, estes tempos de semi-vida são muitos baixos. [57]

Estes problemas podem ser resolvidos utilizando um transportador conjugado com os CORMs (Figura 1.8). Os CORMs de ligação covalente ou encapsulados numa estrutura protetora do hospedeiro devem aumentar os tempos de semi-vida, especialmente para CORMs onde a libertação do CO é induzida por reações de troca de ligandos, como é o caso do CORM-2. [57]



**Figura 1.8:** Inalação de CO vs. administração de CORMs. Distribuição terapêutica de CO aos tecidos doentes com as suas principais vantagens e desvantagens (adaptado de "Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide" [46]).

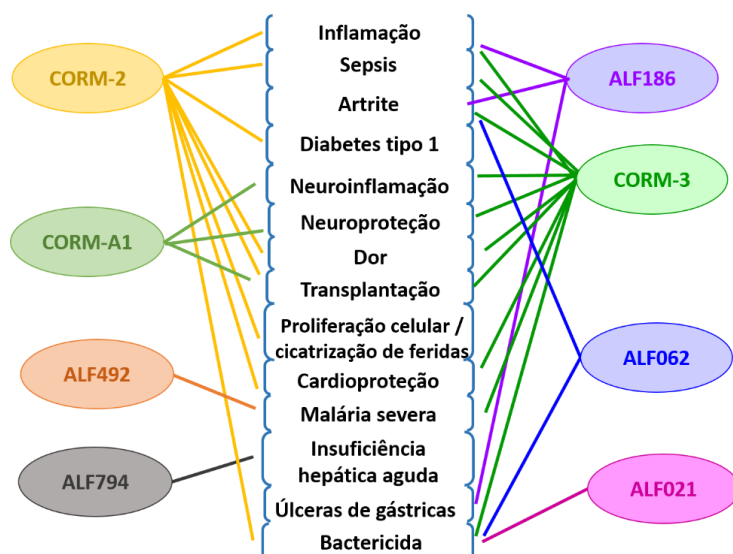
O desenvolvimento de carbonilos de metais de transição como os CORMs representa uma nova estratégia para uma entrega mais segura de produtos farmacêuticos baseados em CO no tratamento de vários distúrbios patológicos. [50] Uma das vantagens mais importantes associadas à administração de tais pró-fármacos é a possibilidade de controlar, direcionar e idealmente, minimizar a quantidade de CO em circulação. A principal desvantagem é que, como qualquer outro pró-fármaco, a liberação do princípio ativo, CO, a partir de uma estrutura molecular produz metabolitos que devem ser toxicologicamente seguros. [58]

### 1.8.3 Monóxido de carbono e inflamação

A capacidade de modular e, em particular, limitar a inflamação, foi um dos primeiros efeitos biológicos benéficos descritos para o CO. Em 2005, um grupo de investigadores demonstraram pela primeira vez que o CORM-2 e o CORM-3 preveniam a inflamação induzida por LPS na linha celular RAW264.7 (macrófagos murinos). Desde então vários trabalhos confirmam o papel anti-inflamatório de vários CORMs (Figura 1.9). [59]

Outro estudo em modelos com artrite induzida mostram que o CORM-3 é capaz de suprimir as manifestações clínicas e histológicas da doença. Neste caso, os grupos estudados desenvolveram a doença de maneira semelhante, observando-se que no final do tratamento o grupo onde o CORM-3 foi utilizado apresentava menor inflamação e menor erosão óssea comparativamente ao grupo de controlo. [60]

Uma concentração fisiologicamente relevante de CO encontra-se na faixa de 100 a 500 ppm. Nesta faixa de concentrações, o CO inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, e estimula a síntese da citocina anti-inflamatória interleucina-10. O efeito anti-inflamatório do CO é mediado pela quinase p38, mas independente da via do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A interleucina-10 induz a expressão de hemo oxigenase-1 (HO-1), que vai produzir mais CO. Desta forma, o efeito anti-inflamatório do CO é ampliado. [48]



**Figura 1.9:** Esquema representativo da atividade terapêutica de diferentes CORMs (adaptado de "Bioorganometallic Chemistry Applications in Drug Discovery, Biocatalysis, and Imaging" [59]).

## 1.9 LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Quando um fármaco é administrado, apenas uma pequena parte da dose atinge o tecido alvo, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o tecido alvo. <sup>[61]</sup> Aliando isto ao facto de alguns fármacos apresentarem uma ação de curta duração, surgiu a necessidade de desenvolver soluções terapêuticas que permitam contornar estes problemas, permitindo minimizar os efeitos adversos e maximizar o tempo de libertação do fármaco. Aparecem então os sistemas de libertação controlada de fármacos.

Os fármacos possuem uma banda de ação terapêutica acima do qual se tornam tóxicos e abaixo da qual se tornam ineficazes. <sup>[62]</sup> O objetivo dos sistemas de libertação controlada de fármacos é então manter a concentração do fármaco libertado na sua banda terapêutica. <sup>[63]</sup>

Nos dias de hoje, a libertação controlada de fármacos está associada à nanotecnologia, devido à utilização de nanopartículas (NPs) para a criação destes sistemas. A intenção desta utilização das NPs tem como objetivo acumular o fármaco e otimizar o tempo de libertação deste no local alvo, o que apenas se torna possível se as NPs apresentarem maior estabilidade na presença dos fluidos biológicos, e possibilitarem pelo menos a mesma ação terapêutica que o composto livre. <sup>[62]</sup>

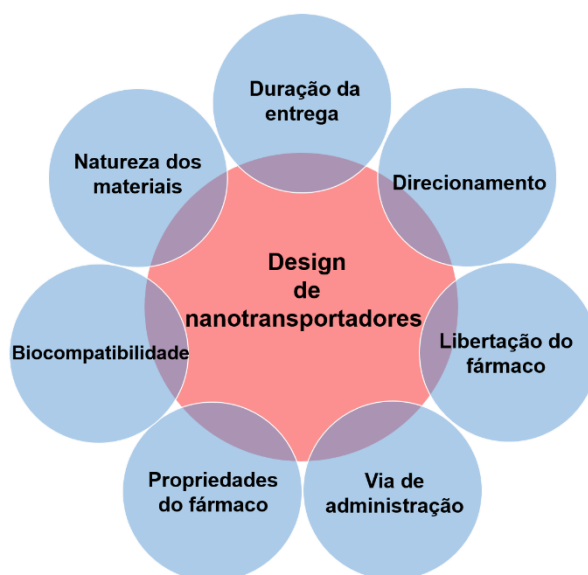
Os sistemas de libertação controlada de fármacos baseados em NPs podem ser desenvolvidos de modo a ser administrados por diversas vias, conseguirem reter o fármaco no seu interior durante o transporte e libertá-lo apenas no local desejado. <sup>[31,64]</sup>

A forma de conjugar o fármaco ao nanotransportador e a estratégia do seu direcionamento são altamente importantes para se conseguir atingir uma terapia direcionada. Um fármaco pode ser adsorvido ou covalentemente ligado à superfície dos nanotransportadores ou então pode ser encapsulado nele. A ligação covalente tem vantagens sobre as outras formas de ligação, uma vez que permite controlar o número de moléculas de fármaco ligadas ao nanotransportador, o que permite um controlo preciso da quantidade de fármaco que está a ser administrado. <sup>[65]</sup>

Os agentes terapêuticos são libertados quando o conjugado fármaco-nanotransportador atinge o tecido alvo. A libertação controlada do fármaco pode ser obtida por meio de mudanças no ambiente fisiológico, temperatura, pH, osmolalidade ou por meio de uma via enzimática. <sup>[65]</sup>

Os nanotransportadores usados para aplicações médicas devem ser biocompatíveis e não tóxicos. Ao projetar-se o desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de fármacos devem ter-se em conta uma série de características importantes, como é o caso, da duração da entrega do fármaco e da via de administração, por exemplo. <sup>[65]</sup> As principais características a ter em conta estão representadas na figura 1.10.





**Figura 1.10:** Propriedades a serem consideradas para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. (adaptado de "*Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery*"<sup>[69]</sup>).

## 1.10 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma área transversal a vários domínios científicos, visto que requer conhecimentos multidisciplinares, englobando conceitos da biologia, química, física, entre outras áreas. Assim, a nanotecnologia pode ser considerada uma tecnologia de convergência, devido à dependência das várias áreas da ciência nela envolvida.<sup>[67]</sup> É hoje em dia, um campo em rápida expansão, abrangendo o desenvolvimento de materiais artificiais na faixa de tamanhos de 5-200nm, embora existam outros intervalos de tamanhos também considerados. Esta dimensão excede largamente a das moléculas orgânicas padrão, mas a sua gama mais baixa aproxima-se de muitas proteínas e macromoléculas biológicas.<sup>[75]</sup>

A medicina recorre à nanotecnologia devido à necessidade de criar métodos eficazes de entrega de princípios ativos a uma taxa específica, num local específico com toxicidade reduzida ou, idealmente, nula. Este é um objetivo que envolve muitos desafios e que tem levado muitos investigadores a debruçarem-se sobre o assunto.<sup>[68,69]</sup>

No início dos anos de 1970 era considerado impossível administrar suspensões farmacêuticas por via intravenosa devido aos riscos de embolia. Hoje em dia, o desenvolvimento de suspensões de NPs que contêm fármacos tornou possível aumentar o índice terapêutico de muitos componentes, através, por exemplo, da redução da toxicidade, direcionando-os seletivamente para os tecidos e células doentes.<sup>[70]</sup>

Estes veículos surgem como uma estratégia para superar todas estas dificuldades, reduzindo ainda os custos nos cuidados de saúde, visto que podem oferecer um perfil farmacocinético mais adequado.<sup>[71]</sup> Estes veículos surgem em 1950 com o aparecimento das nanoemulsões, após estas surgiram os lipossomas (1965), as nanopartículas poliméricas (1975), as microemulsões (1980), as nanopartículas lipídicas sólidas (1992) e os transportadores lipídicos nanoestruturados (1999-2000).<sup>[72]</sup>



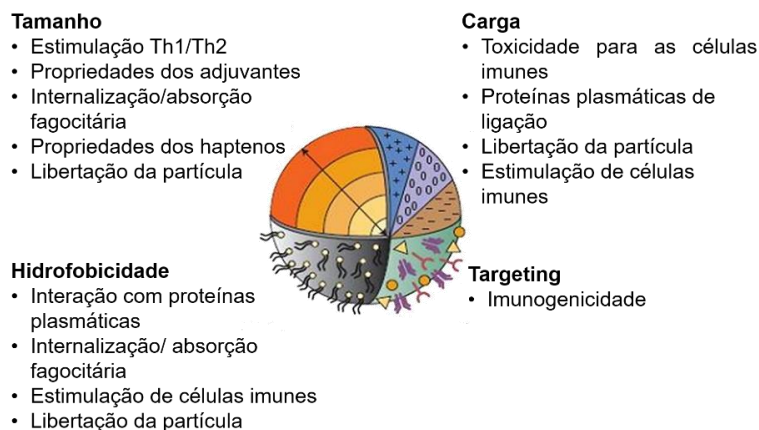
São vários os princípios ativos que têm vindo a ser incorporados neste tipo de sistemas à nanoescala ao longo dos últimos anos (tabela 1.2). Uma das características mais importantes inerente a estes sistemas é o facto de apresentarem um perfil de libertação retardado, o que permite que as concentrações de níveis plasmáticos sofra menos variações, uma redução da frequência de administração e dos efeitos adversos, assim como, uma redução nos custos de saúde. [73]

**Tabela 1.2:** Fármacos comerciais em sistemas de nanoveículos (adaptado de “Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market” [72]).

Nome comercial	Princípio ativo	Tipo de veículo	Usos	País e ano de aprovação
Marqibo ®	Vincristina	Lipossomas	Leucemia linfóide aguda	EUA, 2012
Megace ES ®	Megestrol	Nanocristais	Anorexia,	EUA, 2005
Opaxiol ®	Pacitaxel	Nanoformulações baseadas em polímeros	Glioblastoma	EUA, 2012
Nano Therm ®	Aminosilano	Nanoformulações baseadas em metais	Câncer da próstata e do pâncreas	EUA, 2013
Diprivan ®	Propofol	Nanoformulações baseadas em tensioativos	Agente sedativo	EUA, 1989

Há uma série de propriedades importantes para a entrega de fármacos usando as NPs como veículo, são elas: o tamanho da NP, as propriedades de superfície da NP, o potencial zeta, a encapsulação e libertação do fármaco, entrega direcionada. [74]

O tamanho e a distribuição de tamanho determinam a distribuição *in vivo*, o destino biológico, a toxicidade e a capacidade de direcionamento destes sistemas de entrega, sendo por isso as características mais importantes (Figura 1.11). Estes parâmetros podem também influenciar a encapsulação e libertação do fármaco, assim como a estabilidade das NPs. [74]



**Figura 1.11:** As propriedades das NPs, como o tamanho e a carga, determinam o seu efeito no organismo. (adaptado de "*Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery*" [75]). Onde Th1/Th2 = células T auxiliares tipo 1 e tipo 2 respetivamente.

Para aumentar a probabilidade de sucesso no direcionamento de fármacos é necessário minimizar a opsonização e prolongar a circulação das NPs. Isto pode ser conseguido alterando as propriedades de superfície da NPs, revestindo-a por exemplo com polímeros. [74] Sabe-se que a maioria das NPs sem modificações de superfície são absorvidas principalmente por células fagocíticas, que podem causar interações indesejáveis entre as NPs e o sistema imunológico, levando a uma diminuição na biodisponibilidade do princípio ativo e aumentar a toxicidade no hospedeiro. [75]

A caracterização das propriedades de carga superficial das NPs é levada a cabo através a determinação do potencial zeta. Este reflete o potencial elétrico das partículas e é influenciado pela composição da partícula e do meio na qual ela se encontra dispersa. De uma forma geral, nanopartículas com valores de potencial zeta acima de  $\pm 30$  mV mostram-se estáveis em suspensão, uma vez que a carga superficial previne a agregação das partículas. [74]

Um sistema de *nanodelivery* de sucesso deve ter uma alta capacidade de carga de fármaco, reduzindo assim a quantidade de materiais da matriz para a administração. A eficiência de encapsulação do fármaco depende da solubilidade deste no material da matriz. [74]

A libertação do fármaco depende da solubilidade do fármaco, dessorção do fármaco ligado à superfície ou adsorvido, da difusão do fármaco através da matriz da NP e da combinação de processos de erosão e difusão. Posto isto, são a solubilidade, difusão e biodegradação da matriz que governam o processo de libertação. [74]

A entrega de medicamentos através das NPs pode ocorrer passivamente ou ativamente. A entrega ativa requer que o agente terapêutico se ligue a um tecido ou a um sítio específico da célula. Por outro lado, a entrega passiva é alcançada pela incorporação do agente terapêutico numa macromolécula ou NP que atinge passivamente o órgão alvo. [74]

O uso de nanopartículas lipídicas comparativamente aos tradicionais transportadores coloidais, tais como as emulsões e os lipossomas, prende-se ao facto de estas serem biodegradáveis, não tóxicas e capazes de armazenar/ libertar o fármaco por períodos de tempo mais longos. [76]

### 1.10.1 Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas (LNPs, do inglês *lipid nanoparticles*) representam uma classe diversa de transportadores à base de lípidos que incluem: nanopartículas lipídicas sólidas, transportadores lipídicos nanoestruturados, conjugados lípido-fármaco e nanocápsulas lipídicas. [77]

As vantagens da utilização de LNPs para a entrega de fármacos são o resultado de duas propriedades principais básicas: tamanho reduzido e a utilização de materiais biodegradáveis. Devido ao seu reduzido tamanho, as LNPs podem extravasar através do endotélio em locais inflamados, epitélio (por exemplo, no trato intestinal ou fígado), tumores ou penetrar em microcapilares. Também devido ao seu tamanho é possível uma absorção eficiente por uma variedade de tipos de células e acúmulo seletivos dos fármacos usados nos locais alvo. [74]

No âmbito do projeto desenvolvido as nanopartículas de interesse são as nanopartículas lipídicas sólidas e os transportadores lipídicos nanoestruturados, pelo que apenas essa parte será desenvolvida.

### 1.10.2 Nanopartículas lipídicas sólidas

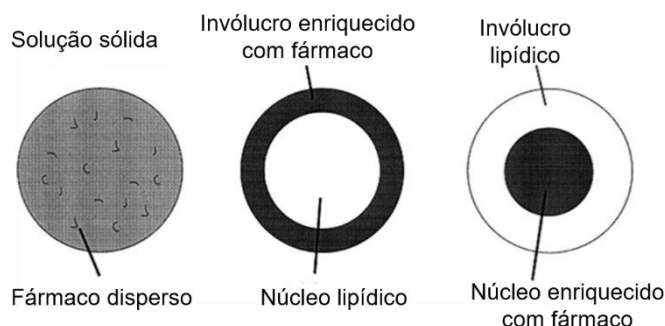
As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs, do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*) são constituídas por lípidos sólidos à temperatura ambiente e corporal e estabilizadas por surfactantes. [66] Foram desenvolvidas como uma classe alternativa de portadores de fármacos coloidais no início dos anos 90 [78] e apresentam, tipicamente, tamanhos que variam entre 40 e 1000nm.

Por apresentarem um núcleo sólido, proporcionam um aumento do controlo da cinética de libertação dos fármacos encapsulados, visto que a mobilidade dos princípios ativos é menor o que leva a uma retardação da reação de degradação. [72]

Como vantagens, destacam-se a capacidade de proporcionar uma libertação controlada dos fármacos encapsulados, excelente tolerabilidade do organismo, estabilidade física e a proteção das substâncias ativas encapsuladas. [79]

Apesar das vantagens que apresentam, possuem também algumas desvantagens, tais como a baixa capacidade de encapsulamento de substâncias ativas e dispersão das mesmas durante o período de armazenamento. É de salientar que estas desvantagens ocorrem sobretudo quando se usa apenas um tipo de lípido sólido. [79]

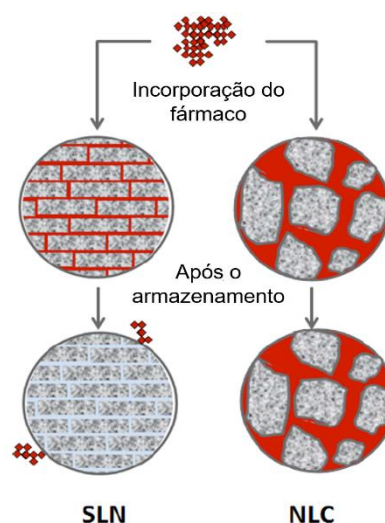
A estrutura e morfologia das SLN são determinadas pela sua composição (lípido e surfactantes) e as características físico-químicas dependem do fármaco e do método de produção. De acordo com a distribuição do fármaco na matriz lipídica sólida, podem descrever-se três estruturas diferentes de SLN (Figura 1.12). [80]



**Figura 1.12:** Modelos de incorporação de fármacos: solução sólida, invólucro enriquecido com fármaco e núcleo enriquecido com fármaco. (adaptado de "Sustained-release from nanocarriers: a review" <sup>[81]</sup>).

O principal desafio das SLN é a expulsão do fármaco no armazenamento devido a arranjos da rede cristalina (transições polimórficas) do lípido sólido (Figura 1.13). <sup>[78]</sup>

Sabe-se que as moléculas lipídicas exibem polimorfismo - apresentam diferentes estruturas tridimensionais. Durante o armazenamento pode ocorrer esse rearranjo resultando numa matriz mais estável e com menos imperfeições, o que faz com que ocorra expulsão do fármaco, contribuindo também para a instabilidade do sistema. Para superar esta desvantagem surgem os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), onde a matriz permanece sólida, mas não cristalina. <sup>[81]</sup>



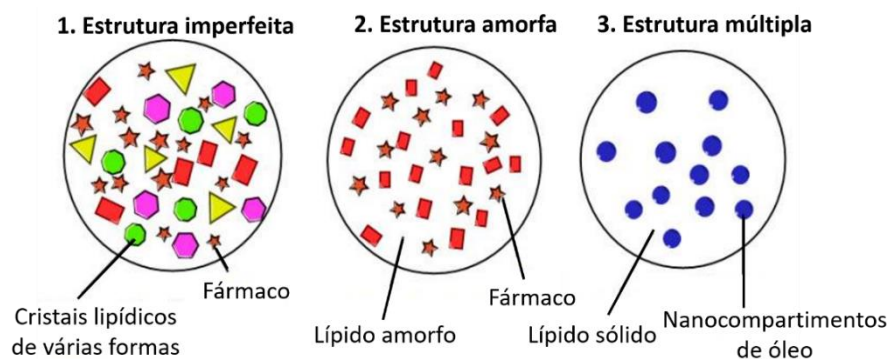
**Figura 1.13:** Diferença entre a estrutura da matriz lipídica de SLNs e de NLCs (adaptado de "Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities" <sup>[81]</sup>).

### 1.10.3 Transportadores lipídicos nanoestruturados

Os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*) surgem como resultado da otimização das SLN. Neste caso, a matriz é constituída por uma fase lipídica sólida e líquida, sendo que a fase aquosa contém um tensioativo ou uma mistura destes. <sup>[72]</sup> Como consequência destas alterações na matriz a estrutura da nanopartícula é menos ordenada, mas por outro lado são também estas alterações que fazem com que seja possível hospedar maiores quantidades de fármaco, que pode ser localizado não apenas entre as cadeias de ácidos gordos e as camadas lipídicas mas também nas imperfeições da matriz lipídica. <sup>[72]</sup>

A imperfeição da matriz possibilita uma maior encapsulação de fármaco em comparação com as SLNs e evita a ocorrência de transições polimórficas na matriz, o que resulta numa maior estabilidade durante o período de armazenamento (Figura 1.13). <sup>[78]</sup>

À semelhança do que acontece com as SLNs também estão descritos três tipos de NLCs. O tipo I (estrutura desordenada) apresenta muitas imperfeições na matriz, criadas quando se usam pequenas quantidades de lípido líquido, que são capazes de armazenar o fármaco. No tipo II (estrutura amorfa) é criado quando a mistura de lípidos especiais evitam a ocorrência de cristalização, a falta da estrutura cristalina pode prevenir ou reduzir significativamente o vazamento do fármaco carregado. Por último, o tipo III (estrutura múltipla) é caracterizado por pequenos nanocompartimentos de óleo dispersos na matriz lipídica sólida (Figura 1.14).<sup>[81, 85]</sup> A obtenção dos diferentes tipos de estruturas vai depender tanto da composição como do método de produção das NPs.<sup>[81]</sup>



**Figura 1.14:** Diagrama esquemático ilustrativo das diferentes estruturas de NLCs (adaptado de "USO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS COMO VEÍCULO DE FÁRMACOS"<sup>[72]</sup>).

#### 1.10.4 Nanopartículas no tratamento da artrite reumatoide

Um sistema de entrega capaz de entregar o fármaco diretamente à cavidade sinovial será mais eficaz do que aqueles que são administrados sistemicamente.<sup>[82]</sup>

Pela capacidade fagocítica que apresentam os macrófagos são alvos passivos para as NPs. As NPs administradas sistemicamente tendem a acumular-se na articulação inflamada devido ao aumento da permeabilidade dos capilares nos locais de inflamação. Pelo facto de os macrófagos apresentarem um papel importante na AR, o uso das NPs com portadoras de princípios ativos para atacar os macrófagos nas articulações doentes é uma abordagem muito promissora para a redução dos efeitos colaterais sistémicos.<sup>[35]</sup> As propriedades que medeiam o processo de direccionamento passivo incluem a estrutura de partículas, tamanho, forma e características de superfície. As nanopartículas podem ser facilmente fagocitadas por macrófagos mesmo sem modificações de superfície. No entanto, os nanoveículos administrados sistemicamente também podem ser eliminados rapidamente por macrófagos existentes no sistema reticuloendotelial (RES, do inglês *reticulo-endothelial system*), diminuindo assim a disponibilidade do fármaco que atinge as articulações inflamadas. Modificações na superfície das NPs para retardar a interação de RES de modo a direccionar ativamente o tratamento estão a ser constantemente exploradas.<sup>[38]</sup>

Assim, vários NSAIDs têm sido encapsulados em lipossomas para serem administrados por via intravenosa e têm demonstrado potentes efeitos anti-inflamatórios, provados pela redução dos níveis séricos de citocinas inflamatórias. [35] A utilização de microesferas lipídicas (LM, do inglês, *Lipid Microspheres*) com PEG (polietilenoglicol) na sua superfície aumenta o tempo de circulação e a biodisponibilidade, e quando administrados em patas de ratos artríticos, leva a uma maior acumulação dos NSAIDs encapsulados nas articulações, adiando a captação pelo sistema retículo endotelial. [38]

Lipossomas de PEG carregados com Prednisolona persistiram na circulação com uma semi-vida de 50 h e uma única administração sistémica desta nanoformulação levou à completa remissão da inflamação no prazo de 2 dias, com efeito por duas semanas. [38]

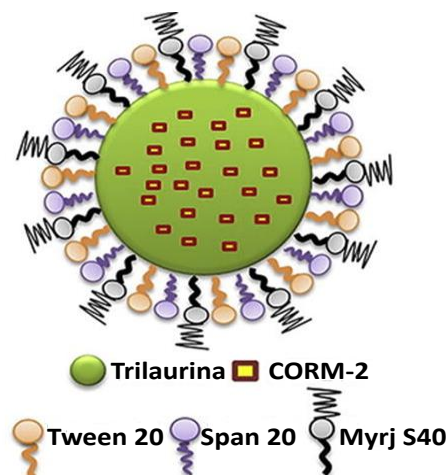
Outra abordagem usa NPs de folato para atingir os macrófagos ativados, visto que estes expressam o recetor de folato  $\beta$ , o que faz com que apenas os macrófagos ativados sejam os alvos das NPs. [35]

Vários estudos com diferentes tipos de NPs que incorporam MTX apresentam resultados promissores, verificando-se uma acumulação do fármaco nas articulações doentes. [35] Um exemplo disso é a utilização de nanopartículas de sulfato de dextrano. Os estudos realizados mostram que as nanopartículas têm como alvo os tecidos afetados com AR induzida e que estas foram internalizadas nas células inflamadas não se verificando, por outro lado, a sua acumulação nos tecidos saudáveis. [83]

Na tabela 1.3 encontram-se listadas algumas das estratégias usadas na administração de alguns fármacos no tratamento da AR.

Em relação aos CORMs são ainda poucos e recentes os estudos realizados onde se procura encapsulá-los em NPs.

Nanopartículas usando trilaurina como lípido sólido, e como surfactante uma mistura de Tween 20 e Span 20 em combinação com Myrj S40, para formar uma concha de superfície estabilizada, foram desenvolvidas para incorporar CORM-2 (Figura 1.15). Estudos realizados mostraram que os efeitos anti-inflamatórios do CORM-2 *in vitro* e *in vivo* eram melhorados quando se usava CORM-2-NPs em comparação com a solução de CORM-2. Utilizando as NPs conseguiu alcançar-se uma libertação controlada do CORM-2. Estes dados são sustentados com base num modelo de inflamação *in vivo*, onde se verificou que o edema da pata de rato induzida por carragenina, sofreu uma redução. [84]



**Figura 1.15:** Representação da estrutura das NPs desenvolvidas incorporando CORM-2 (adaptado de "Enhanced acute anti-inflammatory effects of CORM-2-loaded nanoparticles via sustained carbon monoxide delivery" [84]).

**Tabela 1.3:** Lista de vários medicamentos e suas abordagens de entrega para o tratamento eficaz da AR (adaptado de "Application of Liposomes in Treatment of Rheumatoid Arthritis: Quo Vadis" [82]).

Fármaco	Sistema de entrega	Observação chave
<b>Glucocorticóides</b>		
Prednisolona	Lipossomas	Segmentação de tecidos
	Microesferas	Libertação prolongada
	Nanopartículas	Eficácia melhorada
<b>DMARDs</b>		
Azatioprina	<i>Pellets</i> de libertação sustentada	Menos efeitos colaterais
Leflunomida	Microesferas	Ação rápida
	Microcápsulas	Ação sustentada
Metotrexato	Vesículas multilamelares	Aumento da permeação
	Lipossomas	Segmentação de medicamentos, efeito terapêutico prolongado
	Microesferas	Retenção do fármaco em articulações e menos circulação no sangue
Tacrolimo	Distribuição de fármaco baseada em lípidos encapsulados	Semi-vida prolongada, libertação prolongada do medicamento
	Lipossomas	Entrega oral melhorada
<b>NSAIDs</b>		
Diclofenac	<i>Pellets</i> de libertação sustentada	Menos efeitos colaterais
	Microcápsulas	Libertação sustentada
	Microesferas	Efeito terapêutico longo
	Nanopartículas	Libertação prolongada do fármaco
	Supositórios	Eficácia melhorada
Ibuprofeno	Microemulsões	Aumento da permeabilidade cutânea, aumento da biodisponibilidade oral
	Microesferas	Efeito terapêutico prolongado
	Formulação de libertação sustentada	Efeito terapêutico prolongado e melhor adesão do paciente
	Dendrímeros	Entrega direcionada
	Lipossomas	Menos efeitos colaterais
	Microesferas	Segmentação melhorada
	Nanoemulsões	Biodisponibilidade melhorada através da entrega transdérmica
	Supositórios	Eficácia terapêutica melhorada
Cetoprofeno	Microesferas	Efeito terapêutico prolongado
	Microcápsulas	Libertação sustentada
	Nanoemulsões	Permeabilidade aprimorada da pele

## 2 MOTIVAÇÃO

---



Como referido anteriormente, os fármacos disponíveis atualmente no mercado para o tratamento da AR apresentam uma ampla gama de efeitos colaterais, associados principalmente à alta dosagem necessária para se atingir o efeito terapêutico.

Tratando-se de uma doença incapacitante torna-se necessário estudar novas formas de controlar os sintomas e de prevenir o avançar da doença. Nos últimos anos muitos têm sido os avanços nas mais diversas áreas da biotecnologia, da química e até da medicina. Desenvolveram-se as LNPs, descobriu-se que o CO para além de efeitos indesejados possui também efeitos benéficos, criaram-se as moléculas libertadoras de CO, etc.

Assim, a presente dissertação procura estudar uma forma mais eficaz de diminuir os problemas associados à AR, bem como diminuir os efeitos colaterais associados aos fármacos atuais.

Os principais objetivos do presente trabalho são:

- Desenvolver uma nova abordagem terapêutica para a artrite reumatoide, baseada no desenvolvimento de nanopartículas lipídicas contendo CORMs;
- Possibilitar um direcionamento ativo das formulações desenvolvidas através da síntese e incorporação de um conjugado seletivo para os recetores de CD44 superexpressos em células inflamadas;
- Otimizar e caracterizar estruturalmente os nanosistemas desenvolvidos;
- Realizar estudos *in vitro* que permitam prever o comportamento de libertação dos compostos em fluidos corporais;
- Determinar os efeitos biológicos dos nanosistemas em linhas celulares.

De forma a atingir os objetivos propostos, vão ser desenvolvidas LNPs onde serão encapsulados CORMs para que se consiga uma libertação mais lenta e controlada do CO do que na administração direta dos CORMs. Para conseguir que CORM-2-NPs seja dirigido às articulações afetadas pela AR a superfície das NPs será funcionalizada com DPPE-HA, visto que as células da membrana sinovial possuem o recetor CD44 à superfície para o qual o ácido hialurónico tem afinidade. Depois do esquema de trabalho se encontrar otimizado espera-se estudar outras formas de funcionalização para a superfícies das NPs tendo em conta que o recetor em estudo não é específico para a AR.

Na fase final do serão realizados estudos em linhas celulares, nomeadamente na linha celular THP1, para avaliar a toxicidade e efeitos anti-inflamatórios dos CORMs em estudo.

### **3 PARTE EXPERIMENTAL E MÉTODOS**

---

### 3.1 REAGENTES E SOLVENTES

Na tabela seguinte (Tabela 3.1) apresentam-se todos os reagentes usados na execução do trabalho experimental, assim como, o respetivo grau de pureza e marca.

**Tabela 3.1:** Designação do grau de pureza e marca dos reagentes utilizados.

Nome	Grau de Pureza	Marca
Ácido Oleico	90%	ALDRICH
CORM-2	-	ALDRICH
Gelucire	-	GATTEFOSSÉ
Tween 80	-	SIGMA-ALDRICH
DMSO	≥99.9%	SIGMA-ALDRICH
RPMI	-	gibco®
NHS	≥98%	SIGMA-ALDRICH
EDC	≥98%	SIGMA-ALDRICH
DPPE	-	Avanti® Polar Lipids, Inc.
HA	-	Genzyme-Sanofi Corp.
PBS	-	SIGMA
FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF POWDER	-	biorelevant.com
NaOH	≥99%	AnalaR NORMAPUR
HCl	-	Fisher chemical
H <sub>2</sub> NaO <sub>4</sub> P.H <sub>2</sub> O	≥99%	Fluka
NaCl	≥99.5%	SIGMA-ALDRICH
Resazurina	-	SIGMA-ALDRICH

Os CORMs usados ao longo do trabalho, com a exceção do CORM-2, foram fornecidos pelo professor Carlos Romão do Laboratório de Química Organometálica do Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier (ITQB, Universidade Nova de Lisboa).

### 3.2 MATERIAIS

Todos os materiais usados na execução do trabalho experimental encontram-se registados na tabela a seguir apresentada (Tabela 3.2), assim como, o respetivo modelo (se aplicável) e a marca.

**Tabela 3.2:** Registo do modelo e marca dos materiais utilizados

Nome	Modelo	Marca
Membrana diálise T1	-	Cellu Sep
Membrana diálise T2	OrDial D80	Orange Scientific
Slide-A-Lyzer®	Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette (Extra Strength)	Thermo SCIENTIFIC
Float-A-Lyzer® G2	Float-A-Lyzer®G2 Dialysis Device	Spectrum Laboratories, Inc
Amicon	Amicon® Ultra - 4	MERK Millipore
Filtro 0.2µm	Minisart®	sartorius

### 3.3 EQUIPAMENTOS

Todos os equipamentos usados na execução do trabalho experimental encontram-se registados na tabela a seguir apresentada (Tabela 3.3), assim como, o respetivo modelo e a marca.

**Tabela 3.3:** Registo do modelo e marca dos equipamentos utilizados

Nome	Modelo	Marca
Placa de agitação/aquecimento	RT 15power	IKA® - WERKE
Sonicador	Vibra-cell™ VCX 130	SONICS®
Balança	ABT-5DM	KERN
DLS	ZetaPALS	Brookhaven
Espectrofotómetro	V-600 Spectrophotometer	JASCO
Leitor de placas	Synergy HT	BioTeck
Centrifuga	Allegra® X-15R Centrifuge	BECKMAN COULTER
Centrifuga (cultura celular)	Heraeus Multifuge X1R	Thermo SCIENTIFIC
Câmara de fluxo laminar	Bio II Advance	Telstar
FTIR-ATR	FT-IR Spectrometer Frontier	PerkinElmer
Liofilizador	LyoQuest	Telstar
Estufa (cultura celular)	UniEquip	Unitherm 3503-2-IR
Sistema água ultra-pura	aruim® pro	sartotius

### 3.4 SÍNTESE

#### 3.4.1 Síntese do conjugado DPPE-HA

Apesar de existirem no mercado fármacos altamente eficazes na redução da inflamação, o seu uso por longos períodos de tempo é dificultado por efeitos adversos graves, baixa

biodisponibilidade dos princípios ativos e um perfil de biodistribuição fora do alvo, limitando assim a sua eficiência terapêutica. Numa tentativa de ultrapassar esses inconvenientes e, eventualmente aumentar a duração da terapia, as NPs desenvolvidas foram funcionalizadas com um conjugado do ácido hialurônico (HA), como uma estratégia de entrega direcionada dos CORMs para a AR. A utilização deste conjugado surge pela capacidade de o HA atingir seletivamente as células sinoviais para promover a libertação controlada de CORM. [85]

Das células encontradas na membrana sinovial inflamada, os macrófagos e fibroblastos são fundamentais na progressão da inflamação, excretando mediadores pró-inflamatório e desencadeando a destruição estrutural irreversível da articulação. Além disso, o HA é responsável pelo crescimento celular e manutenção da integridade tecidual, sendo já utilizado em abordagem de nanoterapia na AR. [85] As estratégias de direcionamento com o conjugado do HA dependem da sua ligação seletiva ao recetor CD44, sub-expresso em células ativadas encontradas na membrana sinovial inflamada e envolvidas na resposta autoimune. [85]

Assim, recorreu-se à síntese do conjugado DPPE-HA para funcionalizar a superfície das NPs esperando aumentar a biodisponibilidade *in situ* dos CORMs, ao mesmo tempo em que espera diminuir os efeitos colaterais que possam estar associados a este tipo de compostos, ao serem distribuídos seletivamente.

A síntese do conjugado foi levada a cabo reproduzindo o esquema reacional que se encontra representada no anexo 7.1. O plano de síntese trata-se de uma adaptação dos trabalhos de Gouveia V.M. [85] e de Cosco D. [86]

Inicialmente efetua-se a ativação do ácido hialurónico (HA). Para tal, dissolvendo-se 100 mg de HA em 50 mL de água, e sonicando-se num banho de gelo (15 min, pulso contínuo, amplitude de 70%). Após os 15 minutos coloca-se a incubar a 37 °C durante 2 h com 500 mg de hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'etilcarbodiimida (EDC) e 520 mg de N-hidroxissuccinimida (NHS), a pH 4 (ajustado com solução 1M de HCl). Terminadas as 2 h, adicionam-se 100 mg de 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), e ajusta-se o pH a 8,6 com tampão borato, coloca-se a incubar por 24 h a 37 °C.

No final da incubação, centrifuga-se (5500 rpm, 4 °C, 40 minutos) para separar o excesso de reagentes do produto final, repetindo o processo 3 vezes, lavando com PBS para reduzir ao pH fisiológico. Posteriormente, o composto obtido é ressuspensionado em PBS e colocado numa membrana de diálise por 24 h (PBS, temperatura ambiente). O produto final (Figura 3.1) purificado é liofilizado. A caracterização é efetuada com base nos dados obtidos por FTIR.

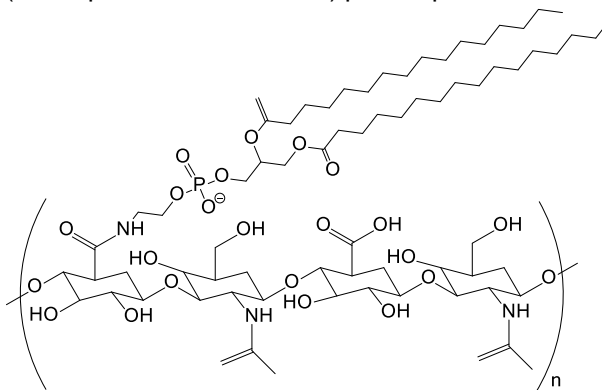


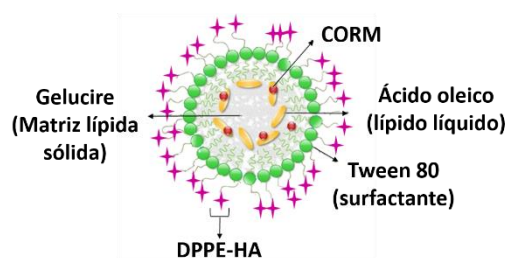
Figura 3.1: Representação da estrutura do conjugado DPPE-HA.

### 3.4.2 Síntese das NPs lipídicas

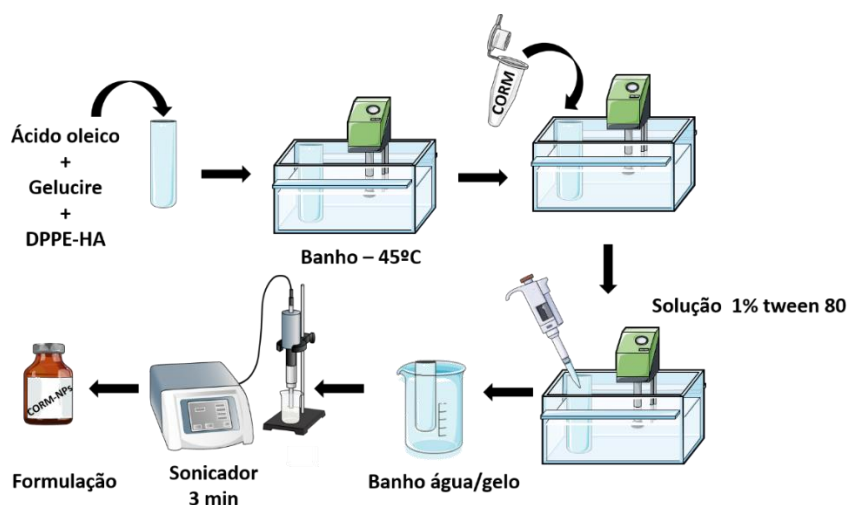
Para sintetizar as NPs lipídicas, utilizam-se dois tipos de lípidos, o gelucire e o ácido oleico, de modo a obter-se uma nanopartícula como a que se encontra-se representada esquematicamente na figura 3.2.

Toda a síntese é realizada ao abrigo da luz, para evitar a degradação dos CORMs usados.

Inicialmente colocam-se 200 mg de gelucire, 50 mg de ácido oleico e 4 mg de DPPE-HA num tubo de formulação que se coloca num banho a 45 °C. Após a mistura estar fundida adiciona-se o CORM, agitando manualmente até se verificar a máxima dissolução possível. Após este processo, adicionam-se 4 mL de solução 1% de polisorbato 80 (Tween 80) e coloca-se o tubo de formulação num banho de água e gelo. O mais rapidamente quanto possível, leva-se a mistura ao sonicador (3 minutos, pulso contínuo, amplitude de 70%), após levar ao sonicador a formulação obtida retira-se do gelo e transfere-se para um recipiente devidamente rotulado e protegido da luz, a figura 3.3 representa todo o processo de síntese.



**Figura 3.2:** Esquema representativo das NPs que se pretende obter.



**Figura 3.3:** Esquema representativo da Síntese das NPs lipídicas.

## 3.5 MÉTODOS

### 3.5.1 Dispersão dinâmica da luz

A dispersão dinâmica da luz (DLS, do inglês “*Dynamic Light Scattering*”) é uma técnica bem estabelecida para medir o tamanho e a distribuição de tamanhos da partícula. Baseia-se na capacidade das partículas em suspensão se difundirem em todas as direções e estarem em movimento constante (movimento Browniano). Este movimento faz com que a luz que incide nas partículas seja espalhada com diferentes intensidades. <sup>[87]</sup> O princípio do método consiste em

relacionar a velocidade de difusão das partículas provocada pelo seu movimento Browniano com o tamanho das mesmas. A intensidade de dispersão da luz detetada está diretamente relacionada com a velocidade de difusão das partículas e consequentemente com o tamanho destas. Assim, partículas mais pequenas apresentam uma maior velocidade. [67]

Recorreu-se a esta técnica para acompanhar o processo de desenvolvimentos das NPs lipídicas, sendo assim possível, obter informação sobre o seu tamanho e valor da polidispersão (PDI, do inglês, *polydispersity index*). O índice de polidispersão é um parâmetro calculado pela análise da função de autocorrelação da intensidade de dispersão da luz. Aqui, assume-se um único valor para o tamanho da partícula e é aplicado um ajuste exponencial simples à função de autocorrelação. Os valores obtidos são usados para descrever a largura a distribuição de tamanhos das partículas. [67]

As nanopartículas produzidas foram caracterizadas pelo seu diâmetro médio e pela sua distribuição de tamanhos. Para tal utilizou-se um analisador de tamanho de partículas (Brookhaven Instruments Corporation; Software: Particle Sizing v.5 Brookhaven Instruments; Holtsville, NY, EUA), operando com um ângulo de espalhamento de 90°, a 25 °C, e índice de refração das partículas ajustado para 1,33. As medições foram efetuadas em 4 ciclos de 2 minutos cada, obtendo-se assim o tamanho médio das formulações e o índice de polidispersão. As formulações analisadas, antes de efetuar as medições, foram diluídas (1:100).

### 3.5.2 Potencial Zeta

Grande parte das partículas dispersas num meio aquoso tende a adquirir uma carga elétrica superficial, sobretudo, devido a mudanças na interface com o meio envolvente mas também devido à dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de espécies iónicas presentes no meio aquoso de dispersão. [67,88]

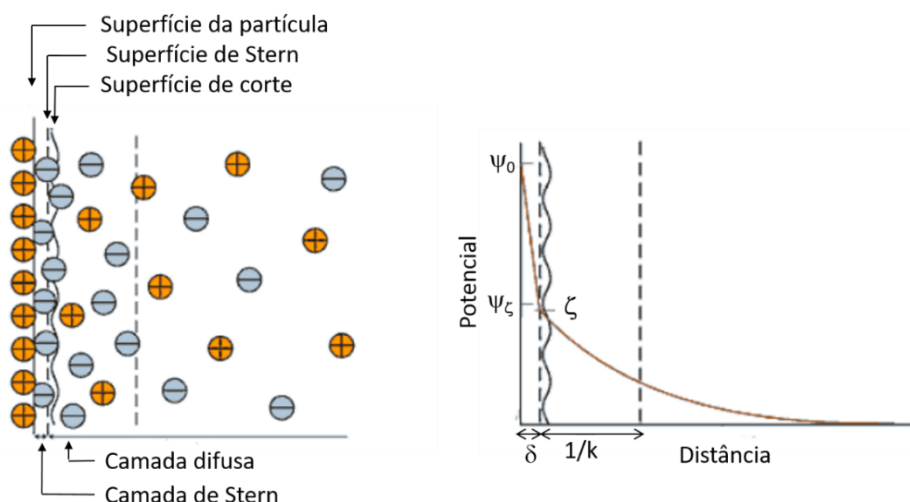
A carga superficial modifica a distribuição de iões envolventes, resultando assim num aumento da concentração de iões à volta da partícula, conferindo-lhe assim uma camada elétrica dupla. Nesta dupla camada, a parte interna é onde se encontram iões fortemente ligados à superfície da partícula enquanto a parte externa é variável, onde fatores como a temperatura e forças eletrostáticas determinam a disposição dos iões. Nesta parte externa, o potencial tende a decrescer com o afastamento da partícula até atingir o valor zero. [67,88]

A parte interna da dupla camada elétrica e a partícula movem-se como um só, fazendo com que a parte externa se arraste e provoque o rompimento entre os iões das duas partes. A região onde ocorre este rompimento chama-se superfície de corte. Assim, o potencial zeta define-se como a diferença de potencial elétrico entre a superfície de corte e um ponto no fluido da suspensão (Figura 3.4). [67,88]

Para calcular o potencial zeta pelo espalhamento de luz utiliza-se o método de dispersão de luz eletroforética (ELS, do inglês *Electrophoretic Light Scattering*). Para tal, 2 eletrodos são inseridos na formulação criando um potencial elétrico que atrai as partículas de carga oposta. O

movimento criado por esta migração é analisado e a velocidade das partículas é medida pelo desvio da luz, com este parâmetro é possível calcular o potencial zeta das partículas. [89,90]

A caracterização das NPs em termos de potencial zeta foi realizada num analisador de potencial zeta (ZetaPALS, Brookhaven Instruments Corporation, Software: PALS Zeta Potential Analyzer v.5, Brookhaven Instruments; Holtsville, NY, EUA), a 25 °C. As medições foram realizadas por 4 corridas de 10 ciclos cada. Do mesmo modo que para o tamanho médio e a polidispersão, as formulações foram diluídas (1:100) antes de se efetuar as medições.



**Figura 3.4:** Representação esquemática do potencial zeta (adaptado de *Brookhaven Instruments Corporation*).

### 3.5.3 Microscopia eletrónica de transmissão

Devido ao seu pequeno tamanho, surgem dificuldades experimentais nos estudos das nanoestruturas, o que limita o uso das técnicas tradicionais para medir as suas propriedades físicas. A técnica de microscopia eletrónica de transmissão (TEM, do inglês *transmission electron microscopy*) pode fornecer informações de imagem, difração e espectroscopia, de maneira simultânea, da amostra com resolução espacial nanométrica. [87]

Durante a caracterização por TEM, a dispersão de nanopartículas é depositada em grelhas ou filmes de suporte. Após a dispersão, eles são fixados com um material de coloração negativa para as imagens ficarem com um maior contraste [87]

As características da superfície da amostra são obtidas fazendo incidir um feixe de elétrons sobre a amostra, que interagem com a mostra à medida que ela passa. [87]

A obtenção das imagens referentes aos placebos foi alcançada após diluição da amostra num fator 1:10 em água ultrapura e as imagens referentes ao CORM-2 foram obtidas sem necessidade de diluição. As amostras foram preparadas colocando-se 10 µL da suspensão numa grelha de malha de cobre por 2 minutos, após esse tempo o excesso foi retirado. A amostra foi então corada com 10 µL de 0,75% de acetato de uranilo por 30 segundos para melhorar o contraste da imagem. O excesso de solução foi então removido e as amostras foram observadas



num Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1400 (TEM Jeol JEM-1400; JEOL Ltd, Tóquio, Japão) com uma voltagem de aceleração de 80 kV.

### 3.5.4 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) do CORM foi determinada por um método indireto, calculando a diferença entre a quantidade total de CORM usado para produzir as formulações e a quantidade de CORM livre que permanece em solução.

As formulações foram diluídas com água ultra-pura (2:15) e centrifugadas em tubos Amicom® Ultra (50,000 MWCO, MERK Milipore) (15 minutos, 3500 rpm, temperatura ambiente). O CORM livre presente no sobrenadante foi quantificado por espectroscopia de UV-Vis usando um espectrofotômetro V-660 (Jasco Corporation, Software: Spectra Manager v.2, Jasco Corporation; Easton, MD, EUA), utilizando-se uma faixa de comprimentos de onda entre os 600-200nm. De forma a que as soluções estivessem nas mesmas condições que os padrões da reta de calibração, antes da leitura foi adicionado DMSO para que no final a sua percentagem fosse de 5%.

A fórmula para o cálculo da eficiência de encapsulação encontra-se representada na figura 3.5.

$$EE(\%) = \frac{CORM_{Total} - CORM_{Livre}}{CORM_{Total}} \times 100$$

Figura 3.5: Fórmula utilizada para o cálculo da eficiência de encapsulação.

### 3.5.5 Capacidade de *loading*

A capacidade de *loading* (LC, do inglês *loading capacity*) é calculada tendo por base a eficiência de encapsulação do CORM, segundo a fórmula que se encontra representada na figura 3.6.

$$LC = \frac{EE \times CORM_{Total}}{massa\ de\ lipidos + surfactante\ total}$$

Figura 3.6: Fórmula utilizada para o cálculo da capacidade *loading*.

### 3.5.6 Estabilidade

A estabilidade das NPs foi determinada pela análise estatística realizada com o apoio do *software* GraphPad (v. 7.0, La Jolla, EUA). Os dados foram analisados usando a análise de variância (ANOVA). Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.5.7 FTIR

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica qualitativa ou semi-quantitativa que permite ter informação sobre as vibrações moleculares. Os grupos funcionais podem ser associados com bandas de absorção na zona do infravermelho características que correspondem às vibrações fundamentais dos grupos funcionais. [92]

A frequência de vibração depende da força de ligação com frequências mais altas para ligações triplas ou duplas em comparação com ligações simples. Depende também da massa dos átomos envolvidos na vibração. [92]

Esta técnica foi utilizada para verificar a formação do conjugado direcionado ao recetor de CD44, DPPE-HA, usando-se para tal um aparelho da marca PerkinElmer (Frontier™; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA) a operar numa gama de comprimentos de onda de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$ , resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , intervalo de dados de 2  $\text{cm}^{-1}$  e acumulações de 32.

### 3.5.8 Ensaios de libertação *in vitro*

Os estudos de libertação *in vitro* têm como objetivo traçar um perfil de libertação dos compostos usados antes de se iniciarem estudos deste género *in vivo*, ajudando também a entender se a utilização das NPs está ou não a ter o efeito pretendido - retardar a libertação do composto e fazer com que essa libertação seja tão controlada quanto possível. Para tal, faz-se uma comparação entre a solução de composto livre e o composto nas NPs. As duas soluções são colocadas numa membrana de diálise, que se deixa a hidratar de um dia para o outro. Estas membranas são depois colocadas em contacto com um meio (que é escolhido de acordo com o meio fisiológico que se pretende estudar – PBS, para simular o pH fisiológico, FaSSGF, para simular o meio gástrico em jejum, FaSSIF e FeSSIF, para simular o meio intestinal em jejum e alimentado respetivamente).

Durante a primeira hora, foram recolhidas alíquotas de 15 em 15 minutos, após esse tempo recolheram-se alíquotas de hora em hora. A cada alíquota recolhida repôs-se o mesmo volume com o meio que se está a usar. Devido à possível degradação dos compostos pela luz, o ensaio foi realizado ao abrigo da luz.

De modo a traçar o perfil de libertação, as alíquotas recolhidas são analisadas por espectroscopia de UV-Vis usando um espectrofotómetro V-660 (Jasco Corporation, Software: Spectra Manager v.2, Jasco Corporation; Easton, MD, EUA) utilizando-se uma faixa de comprimentos de onda entre os 600-200nm, determinando-se posteriormente a taxa de libertação.

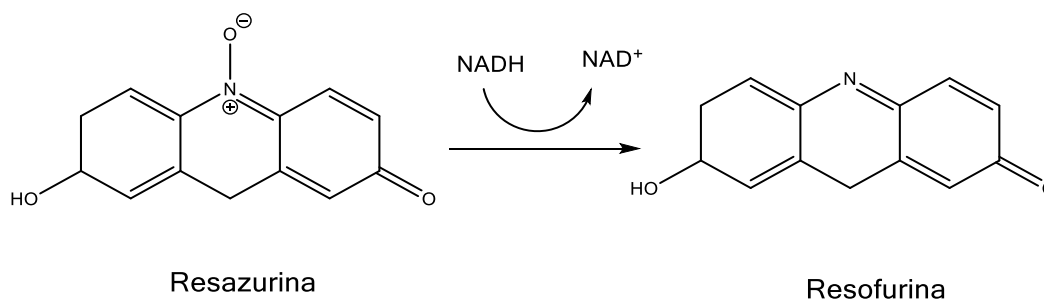
### 3.5.9 Ensaios com linha celulares

Na realização destes ensaios utilizou-se a linha celular THP1. É uma linha celular monocítica de leucemia humana, que tem sido utilizada para estudar as funções dos

monócitos/macrófagos, vias de sinalização e transporte de nutrientes e fármacos. Esta linha foi isolada do sangue periférico de um paciente do sexo masculino de 1 ano de idade com leucemia monocítica aguda. [91] Os objetivos dos ensaios com a linha celular THP1 são, primeiramente, avaliar a toxicidade das formulações desenvolvidas, através de ensaios de resazurina (AlamarBlue®). E, posteriormente, fazer estudos de atividade anti-inflamatória das formulações.

### 3.5.9.1 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio AlamarBlue monitoriza o ambiente redutor da célula viva. O seu princípio ativo é a resazurina, que é solúvel em água, estável em meio de cultura, não tóxico e permeável através das membranas celulares. [93] A resazurina é um indicador redox permeável às células que pode ser usado para monitorizar o número de células viáveis com protocolos semelhantes aos que utilizam o substrato MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). [94,95] A resazurina, é um corante azul não fluorescente que é reduzido a resofurina altamente fluorescente e cor-de-rosa (figura 3.7). Este corante atua como um aceitador de eletrões intermediário na cadeia de transporte de eletrões sem interferência na transferência normal dos mesmos. [93] A mudança de estado oxidado para reduzido permite flexibilidade de detecção onde as medidas podem ser quantitativas, como leituras calorimétricas e/ou fluorométricas (sendo estas ultimas mais sensíveis) ou qualitativas como a mudança visível na cor indicando presença ou ausência de células viáveis. [93] A quantidade de resofurina produzida é proporcional ao número de células viáveis. [94]



**Figura 3.7:** Estrutura química da resazurina e do seu produto reduzido resofurina (adaptado de "Cell Viability Assays" [93]).

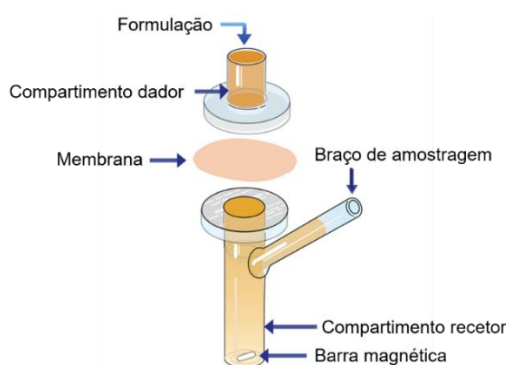
Para a realização deste ensaio, primeiramente procedeu-se à cultura da linha celular THP1 em RPMI, suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% de uma mistura de antibióticos penicilina/ streptomycin, até se obter uma concentração de células suficiente para utilizar  $1 \times 10^5$  células/poço, concentração essa que é determinada recorrendo à contagem das células na câmara de câmara de Neubauer. Para realizar o ensaio procedeu-se à distribuição da suspensão de células em placas de 96 poços. Colocaram-se diferentes concentrações de formulações placebo (uma recente e outra mais antiga) em contacto com a linha celular por um período de 24h. Terminado este tempo, colocou-se diretamente no poço 20 µL de resazurina a 1 mg/mL

(concentração final igual a 0.17 mg/mL) em contacto com as células por 6h. Após este processo, procedeu-se à deteção da fluorescência a um comprimento de excitação de 485 nm e a um comprimento de emissão de 590 nm, utilizando uma placa de fluorescência.

### 3.5.10 Estudos de permeação

A pele humana é uma barreira natural a agentes externos. Medicamentos administrados através de preparações semi-sólidas (cremes, pomadas e géis) devem penetrar nas camadas da pele para exercerem o seu efeito benéfico. Hoje em dia existem técnicas *in vitro* que permitem testar a taxa de libertação de produtos tópicos onde a cinética de permeação da pele é simulada. Esta técnica inclui um dador, uma membrana e um meio recetor que é analisado par determinar a concentração do fármaco ao longo do ensaio. [96]

A célula de difusão de Franz é a técnica mais popular para a realização de estudos de libertação *in vitro* (Figura 3.8). Nestes estudos, a formulação a ser estudada é colocada no compartimento recetor, que é mantido a 32 °C (temperatura usual da pele). A membrana é colocada sobre a abertura de célula de Franz. A formulação é aplicada sobre a membrana, no compartimento dador. As células são agitadas com uma barra magnética e amostras são recolhidas em intervalos de tempo regulares, tipicamente ao longo de 6-8 h. A seleção do meio recetor depende da solubilidade do fármaco. Deve evitar-se a formação de bolhas de ar entre a interface da membrana com o meio recetor. [96]



**Figura 3.8:** Diagrama típico de uma célula de difusão de Franz. Onde se verifica que a célula é constituída por um compartimento dador e um compartimento recetor e a posição da membrana (adaptado de “A REVIEW ARTICLE: IN VITRO RELEASE TECHNIQUES FOR TOPICAL FORMULATIONS” [96]).

Nos estudos realizados, seguiu-se a montagem ilustrada pela figura 4.5, efetuaram-se estudos com CORM-2-NPs e com uma solução livre de CORM-2. No compartimento dador colocaram-se 500 µL de solução dadora, como solução recetora utilizou-se PBS a pH 7,4 com 2% de DMSO (4,7 mL) para garantir a solubilidade do CORM-2, como membrana utilizou-se pele da orelha de porco devido às semelhanças com a pele humana. Pelos motivos referidos anteriormente, escolheu-se a temperatura de 32 °C, utilizando um banho de água para controlar este parâmetro. Recolheram-se amostras (1 mL) nos primeiros 30 minutos seguidas de amostras

de hora a hora, por 6 h. A taxa de permeação foi determinada recorrendo à espectroscopia de UV-Vis usando um espectrofotómetro V-660 (Jasco Corporation, Software: Spectra Manager V.2, Jasco Corporation; Easton, MD, EUA), utilizando-se uma faixa de comprimentos de onda entre os 600-200 nm.

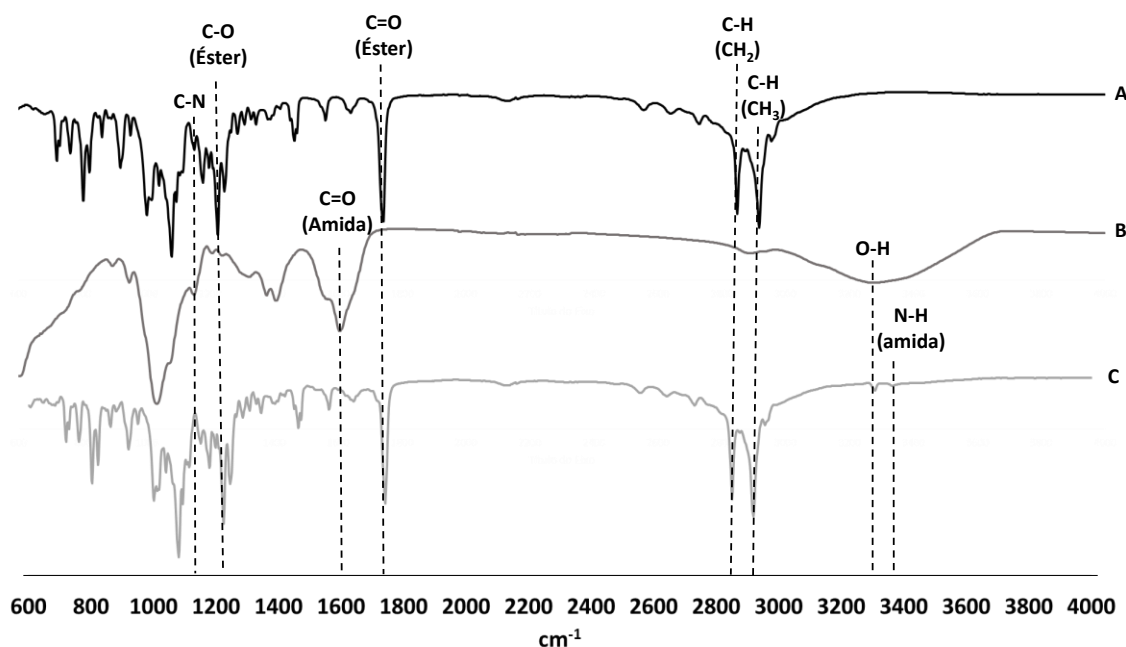
## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

Nesta secção serão apresentados e discutidos todos os resultados obtidos ao longo do projeto desenvolvido. Referir apenas que não foram efetuados todos os estudos com os CORMs fornecidos pelo Laboratório de Química Organometálica (ALF073, ALF153, ALF157), uma vez que, por não serem comerciais as quantidades disponíveis não serem suficientes para a realização de todos os estudos. Assim, resolveu-se avançar com os estudos e otimizações com o CORM-2, visto tratar-se de um CORM comercial.

## 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO DPPE-HA

A caracterização do conjugado sintetizado efetuou-se recorrendo à técnica de FTIR (Figura 4.1). Os espectros obtidos mostram que o DPPE e o DPPE-HA são muito semelhantes, como esperado. Uma análise detalhada permite verificar a presença de bandas a  $1150\text{ cm}^{-1}$ , a  $1608\text{ cm}^{-1}$  e a  $3366\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes, respetivamente às ligações C-N, C=O (amida) e N-H, sugerindo que ocorreu a ligação entre os dois compostos e se obteve o conjugado.



**Figura 4.1:** Representação gráfica dos espectros de FTIR dos principais reagentes utilizados na síntese do conjugado DPPE-HA (DPPE e HA) bem como do produto final (A = DPPE, B = HA e C = DPPE-HA).

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

### 4.2.1 Dispersão dinâmica da luz e potencial zeta

A caracterização das NPs em termos de tamanho, polidispersão e potencial zeta é alcançada através de uma diluição da formulação obtida, 1:100, em água. A diluição obtida é então analisada recorrendo ao DLS. Como se pode verificar na tabela 4.1, as NPs têm todas cerca de 200nm. Tal como esperado, não se verificou uma grande variação para o tamanho ou ZP de COMR-2-NPS com e sem DPPE-HA, sugerindo que o DPPE-HA não traz alterações

significativas à morfologia das NPs. Perante este resultado, e uma vez que tínhamos uma limitação na quantidade de CORMs disponíveis, decidimos fazer a caracterização das CORM-NPs na presença de DPPE-HA. Os resultados obtidos para o ALF013-NPs + DPPE-HA são superiores a todas as outras amostras. Não encontramos nenhuma justificação, o que sugere que estas formulações devem ser repetidas e caracterizadas novamente.

**Tabela 4.1:** Dados obtidos na caracterização das nanopartículas lipídicas obtidas, através da técnica de DLS.

	Tamanho (nm)	PDI	ZP (mV)
<b>NPs</b>	211±2	0,224±0,012	-21±2
<b>NPs + DPPE-HA</b>	204±3	0,192±0,024	-40±2
<b>CORM-2-NPs</b>	190±2	0,189±0,010	-26±2
<b>CORM-2-NPs + DPPE-HA</b>	191±3	0,185±0,011	-31±2
<b>ALF073-NPs + DPPE-HA</b>	237±5	0,166±0,009	-33±1
<b>ALF153-NPs + DPPE-HA</b>	153±3	0,200±0,009	-42±1
<b>ALF157-NPs + DPPE-HA</b>	198±4	0,178±0,011	-30±1
<b>Literatura (CORM-2) <sup>[84]</sup></b>	116±2	0,226±0,019	-22±2

PDI = índice de polidispersão; ZP = potencial zeta

Embora não exista muitos estudos sobre a encapsulação de CORMs reportados na literatura, quando se comparam os valores obtidos com os valores referenciados no trabalho de Qureshi O.S. <sup>[84]</sup> verifica-se que as NPs desenvolvidas apresentam uma melhoria nos valores de polidispersão e de potencial zeta. Contudo, tem de se ter em conta que os valores da literatura reportam para NPs do tipo SLN enquanto as NPs desenvolvidas são do tipo NLC, o que terá influência nos valores obtidos. Pela falta de estudos com CORMs não é possível uma comparação entre NPs do mesmo tipo.

## 4.2.2 Taxa de encapsulação

Para determinar a taxa de encapsulação dos compostos usados recorreu-se a um método indireto. Para tal após as formulações estarem preparadas, fez-se uma diluição de 2:15 em água e, em seguida, colocou-se a solução obtida num tubo amicon e levou-se à centrifuga (3500 rpm, 15 minutos, temperatura ambiente) de modo a separar a fração com nanopartículas da fração aquosa da formulação. À fração contendo as NPs fica retida no filtro de tubo amicon, procedendo-se depois à sua recuperação através da inversão do filtro (3500 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente). Uma vez que o composto usado é insolúvel em água, há a necessidade de adicionar DMSO (5%) para solubilizar a parte que fica nesta fração, determinando-se por fim a taxa de encapsulação recorrendo à técnica de UV-Vis (600-200 nm). Os resultados obtidos, tabela 4.2, mostram que a taxa de encapsulação dos CORMs testados está entre os 94% para



o ALF073 e entre os 98-99% para os restantes CORMs, sugerindo assim que estes são retidos quase na totalidade.

Apesar de a LC calculada aparente ter um valor baixo, este encontra-se dentro dos valores descritos na literatura para LNPs do mesmo tipo, como se pode verificar pelos trabalhos de Lopes-de-Araújo J., <sup>[97]</sup> e de Vieira C.C.A. <sup>[98]</sup>, onde a LC não ultrapassa os 10%.

**Tabela 4.2:** Dados por medição indireta de UV-vis para a taxa de encapsulação das formulações de NPs lipídicas obtidas

	EE (%)	LC (%)
<b>NPs</b>	-	-
<b>NPs + DPPE-HA</b>	-	-
<b>CORM-2-NPs</b>	99±1	5±2
<b>CORM-2-NPs + DPPE-HA</b>	98±2	9±1
<b>ALF073-NPs + DPPE-HA</b>	94±1	7±1
<b>ALF153-NPs + DPPE-HA</b>	98±1	7±1
<b>ALF157-NPs + DPPE-HA</b>	98±1	8±1
<b>Literatura (CORM-2) <sup>[84]</sup></b>	88±4	-

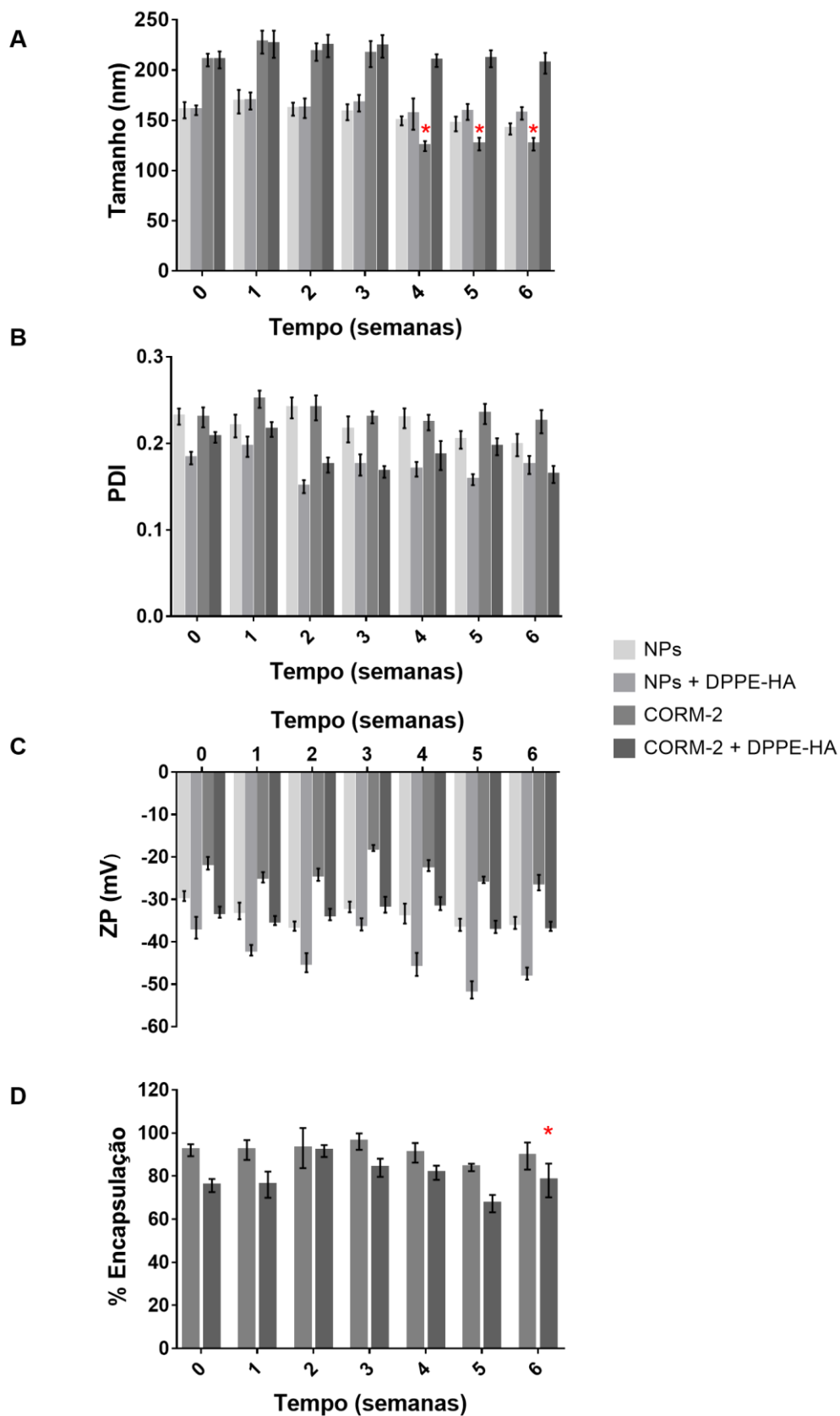
EE = eficiência de encapsulação; LC = capacidade de *loading*

Os valores para a eficiência de encapsulação obtidos para as NPs desenvolvidas foram comparados com o valor obtido nos estudos de Qureshi O.S. <sup>[84]</sup> Pela comparação entre os valores verifica-se que as NPs desenvolvidas para os diversos CORMs apresentam uma eficiência de encapsulação superior ao valor reportado na literatura. Contudo, à semelhança do que acontece nos parâmetros tamanho, PDI e ZP tem de se ter em conta que os valores da literatura reportam para NPs do tipo SLN enquanto as NPs desenvolvidas são do tipo NLC. Pelo polimorfismo que as SLN apresentam, e que não está presente nas NLC seria espectável que os valores obtidos para as NPs desenvolvidas fossem superiores aos valores utilizados como referência, o que se verifica. Pela falta de estudos com CORMs não é possível uma comparação entre NPs do mesmo tipo.

### 4.2.3 Estabilidade

A estabilidade das NPs foi avaliada por um período de 6 semanas. No decorrer desse período de tempo, avaliou-se a estabilidade do tamanho, da polidispersão, do potencial zeta e da taxa de encapsulação das formulações (Figura 4.2). As medições efetuadas foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos anteriormente de acordo com o parâmetro que se

pretendia medir. Verificou-se a estabilidade de formulações placebo (NPs e NPs+DPPE-HA) e formulações de CORM-2 com e sem a funcionalização da superfície das NPs com DPPE-HA.



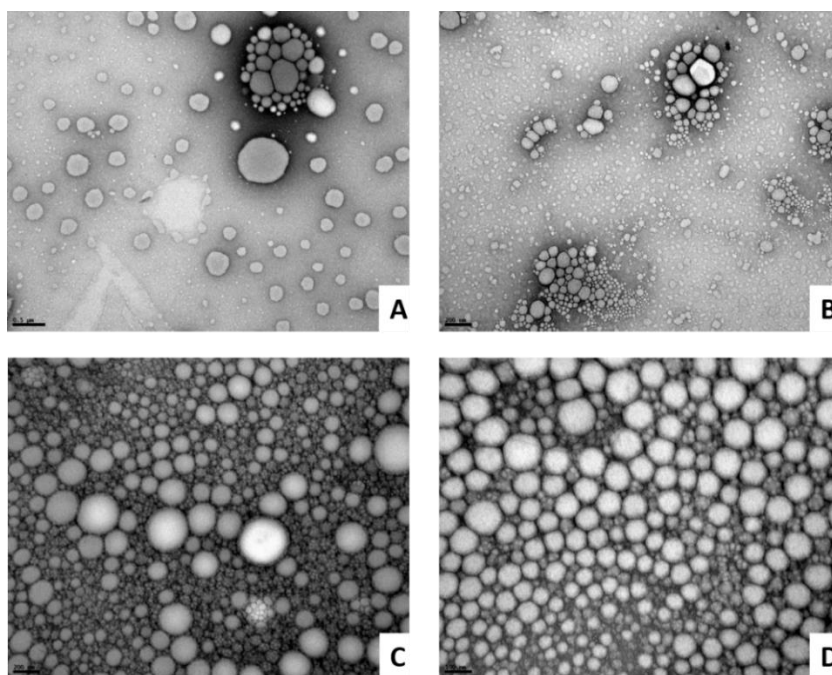
**Figura 4.2:** Representações gráficas referentes aos resultados obtidos para os estudos de estabilidade, para: A – tamanho; B – índice de polidispersão, PDI; C – potencial zeta, ZP; D – percentagem de encapsulação (\*  $p < 0.05$ ).

Pela avaliação dos resultados obtidos para o parâmetro tamanho conclui-se que todas as formulações em tudo são estáveis até às 6 semanas com a exceção da formulação de CORM-2 onde a superfície da NP não foi funcionalizada com o conjugado DPPE-HA. Neste caso, verifica-se um decréscimo no tamanho da nanopartícula a partir da quarta semana. Para os parâmetros PDI e ZP todas as formulações mantiveram os valores com diferenças não consideradas estatisticamente significativas até às 6 semanas. No que respeita à taxa de encapsulação verifica-se que CORM-2-NPs com a funcionalização do conjugado DPPE-HA se mantem estável por 5 semanas enquanto CORM-2 sem funcionalização é estável até às 6 semanas.

Os resultados obtidos podem ter a ver com a saída do CORM-2 da NPs e/ou com a interação que se estabelece entre o DPPE-HA e as nanopartículas.

#### 4.2.4 TEM

As imagens obtidas por microscopia eletrónica de transmissão (Figura 4.3) mostram que as NPs desenvolvidas apresentam uma morfologia esférica, verificando-se ainda assim uma dispersão dos seus tamanhos. Comparando as formulações placebo (A e B) com as formulações que continham CORM-2 (C e D) verifica-se que as primeiras surgem preferencialmente aglomeradas enquanto as formulações com CORM-2 surgem mais dispersas no meio. Possivelmente, isto deve-se a efeitos estéricos. O CORM-2 pode intercalar-se entre as moléculas de surfactante estabilizando a nanopartícula de tal forma que não possibilita a formação de agregados.



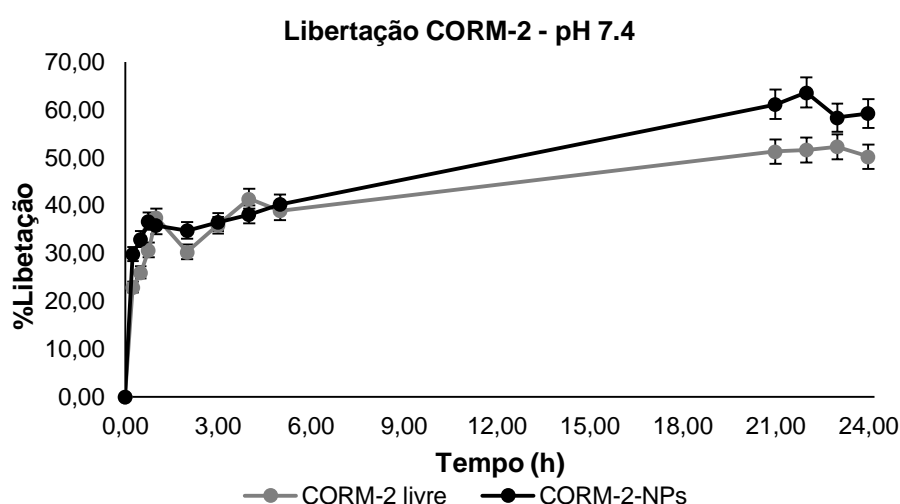
**Figura 4.3:** Imagens obtidas por TEM, onde A e B representam formulações placebo, e C e D representam formulações com CORM-2, em ambos os casos as NPs possuíam a superfície funcionalizada com DPPE-HA.

As imagens representadas referem-se a formulações desenvolvidas em dias diferentes, sendo que as imagens mais recentes à data da recolha das imagens são a B e a D, as formulações referentes às imagens A e C referem-se a formulações mais antigas, tal deve-se ao facto de avaliar a constante tempo na morfologia das NPs. Assim, verifica-se que a formulação mais recente de CORM-2 apresenta maior uniformidade de tamanhos. Nas formulações placebo a constante tempo não causa diferenças significativas na morfologia das NPs.

### 4.3 ESTUDOS DE LIBERTAÇÃO *IN VITRO*

Os estudos de libertação *in vitro* foram levados a cabo testando diferentes condições: agitação, luminosidade e membranas de diálise. As retas de calibração para os respetivos estudos encontram-se nos anexos 7.2 a 7.5.

Inicialmente, foram realizados estudos de libertação com as NPs carregadas com o CORM-2 (CORM-2-NPs) sem a funcionalização da superfície com o conjugado DPPE-HA. Os resultados obtidos não foram muito promissores já que a taxa de libertação do CORM-2 nas NPs quando comparada com a taxa de libertação do CORM-2 livre não era muito diferente, sendo, em certas alturas, superior (Figura 4.4). Não se verificaram alterações significativas com a utilização de membranas diferentes, sendo que foram testados 4 tipos: membrana diálise T1, membrana diálise T2, *Slide-A-Lyzer®* e *Float-A-Lyzer®G2*. Como as diferenças não eram notórias, começou a utilizar-se a membrana diálise T1 nos ensaios posteriores, pelo que os resultados obtidos utilizando-se membranas *Slide-A-Lyzer®* e *Float-A-Lyzer®G2* não serão apresentados.

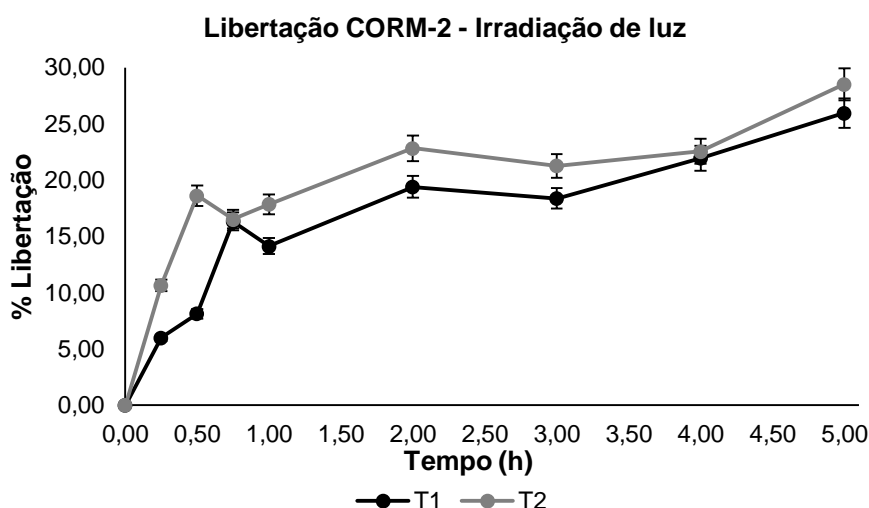


**Figura 4.4:** Representação gráfica dos estudos de libertação *in vitro* do CORM-2, a pH 7.4, usando uma membrana T1, verificando-se se a taxa de libertação do CORM-2 nas NPs é superior à taxa de libertação do CORM-2 livre.

De modo a otimizar o processo de libertação testou-se a taxa de libertação sob irradiação de luz (Figura 4.5), de modo a concluir qual a influência da presença/ ausência de luz nas

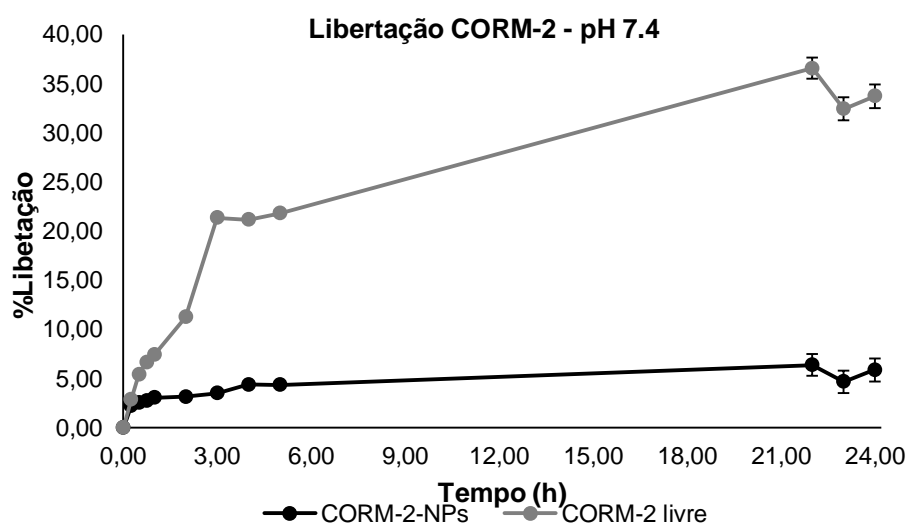
soluções usadas, uma vez que, é conhecido que com irradiação de luz o CO tem a capacidade de se libertar do CORM-2. [48] Nesta situação, optou-se por testar apenas a solução de CORM-2 livre nas membranas de diálise T1 e T2.

Os resultados mostram que os valores obtidos anteriormente, não advêm da membrana em uso, uma vez que, quer para a membrana T1 como para a membrana T2 não se verificam mudanças significativas na taxa de libertação.



**Figura 4.5:** Representação gráfica dos estudos de libertação, *in vitro*, do CORM-2 com irradiação de luz, utilizando as membranas de diálise T1 e T2

Após estas tentativas, funcionalizou-se a superfície das NPs com o conjugado DPPE-HA e realizou-se novamente um estudo de libertação, utilizando uma membrana de diálise T1 (Figura 4.6). Aqui, verificou-se que a taxa de libertação do CORM-2 nas NPs era bastante inferior à taxa de libertação em solução livre, que era o resultado pretendido, visto que, uma libertação mais retardada e controlada trará benefícios no desenvolvimento deste tipo de partículas como agentes anti-inflamatórios.



**Figura 4.6:** Representação gráfica dos estudos de libertação *in vitro* do CORM-2, utilizando NPs com a superfície funcionalizada (com DPPE-HA) e membranas de diálise T1, a pH 7.4.

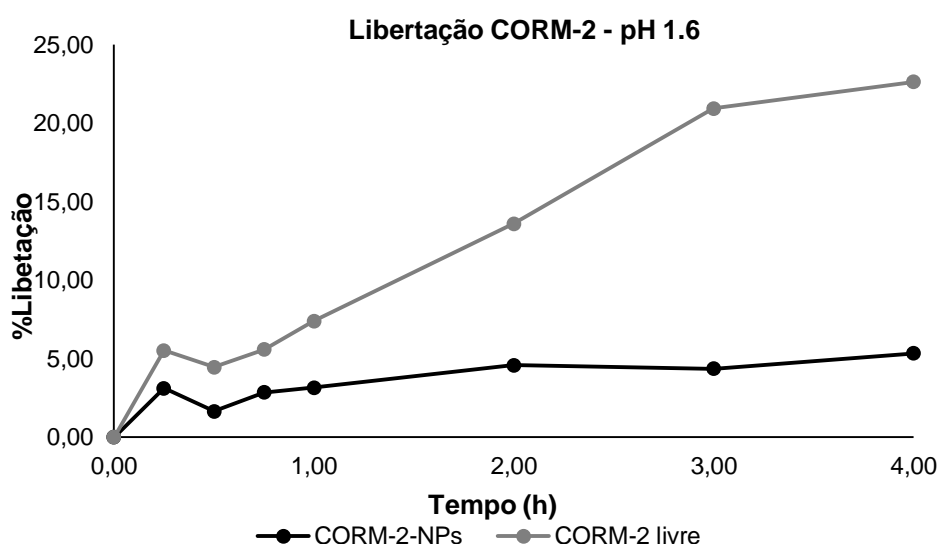
A escolha da funcionalização com DPPE-HA incide no facto de a membrana sinovial possuir recetores CD44, sendo assim uma forma de direccionamento das NPs com HA à superfície para o tecido alvo quando se realizarem estudos mais específicos. Acresce ainda o facto de a síntese do conjugado já ser conhecida pelo grupo, não sendo assim necessárias otimizações no processo de síntese.

Além de tornar as NPs direccionadas para o recetor CD44, o DPPE-HA forma uma barreira hidrofílica na superfície da NPs. Isto, fará com que o CORM-2 tenha mais dificuldade em atravessar a superfície da nanopartícula. Pelo facto de o DPPE-HA ocupar a superfície da nanopartícula o CORM-2 é forçado a ficar no seu interior não havendo oportunidade de que algum dele fique na superfície, o que facilitaria a sua libertação. A junção destes dois factos, leva a que a taxa de libertação do CORM-2- *in vitro* se torne mais lenta e controlada. Assim, a utilização do conjugado torna-se crucial no processo de síntese das NPs para alcançar o efeito pretendido.

Uma vez alcançada a libertação controlada do CORM-2 nas NPs torna-se necessário verificar a libertação noutros meios, simulando os vários fluidos intestinais e gástricos que o candidato a fármaco terá que atravessar se ingerido. Para preparar os diferentes meios usou-se FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF POWDER para preparar as diferentes soluções.

Todas as soluções que simulam os fluidos intestinais e gástricos devem ser preparadas no dia anterior à utilização, utilizados num período de 48 h e armazenados à temperatura ambiente, todos eles contêm na sua composição sais biliares e lecitina.

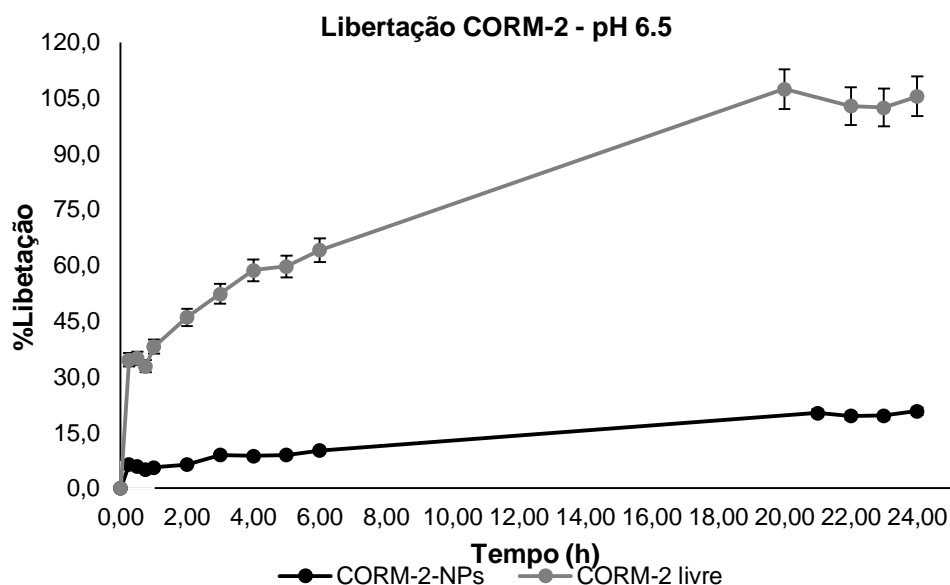
O FaSSGF representa o meio gástrico num estado de jejum, correspondendo a um pH de 1.6. Os resultados obtidos para os estudos realizados com este meio encontram-se representados na figura 4.7.



**Figura 4.7:** Representação gráfica dos estudos de libertação *in vitro* do CORM-2, utilizando como meio FaSSGF para simular o meio gástrico num estado de jejum (pH 1.6), em CORM-2-NPs a superfície das NPs encontra-se funcionalizada com DPPE-HA.

À semelhança dos resultados anteriores, a libertação do CORM-2 nas NPs continua a ser mais lenta e controlada que a libertação numa solução do composto livre. Neste meio, e tendo em conta o tempo normal da digestão, considerou-se um tempo máximo de estudo de 4 h.

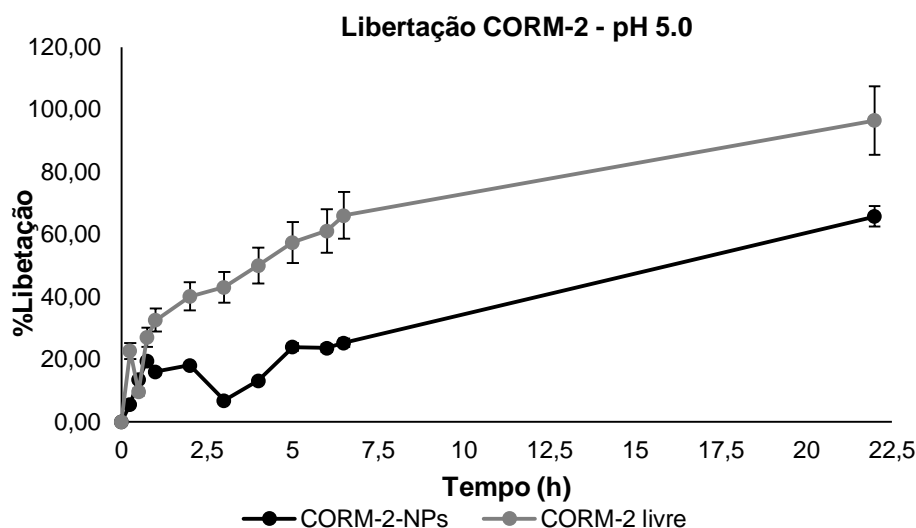
O FaSSIF simula o meio intestinal num estado de jejum, correspondendo a um pH de 6.5. Os resultados obtidos para os estudos de libertação com este meio encontram-se representados na figura 4.8.



**Figura 4.8:** Representação gráfica dos estudos de *libertação in vitro* do CORM-2 utilizando como meio FaSSIF para simular o meio intestinal num estado de jejum (pH 6.5), em CORM-2-NPs a superfície das NPs encontra-se funcionalizada com DPPE-HA.

Os resultados obtidos mostram que a libertação do CORM-2 nas NPs continua a ser controlada, verificando-se que as NPs são resistentes a uma mudança no valor de pH de 7.4 para 6.5. Estes dados são indicativos de que as NPs chegam intactas ao intestino.

Para simular o meio intestinal alimentado usou-se FeSSIF, correspondendo a um pH 5.0. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 4.9.



**Figura 4.9:** Representação gráfica dos estudos de liberação *in vitro* do CORM-2 utilizando como meio FeSSIF para simular o meio intestinal num estado de alimentado (pH 5.0), em CORM-2-NPs a superfície das NPs encontra-se funcionalizada com DPPE-HA.

Este estudo mostra que o CORM-2 nas NPs é libertado lentamente quando comparado com a solução de CORM-2 livre. Contudo, a pH 5.0 verifica-se um aumento da taxa de libertação na fase final do estudo, o que poderá indicar que ao fim de um determinado tempo as partículas começam a degradar-se promovendo assim uma libertação mais rápida do CORM-2.

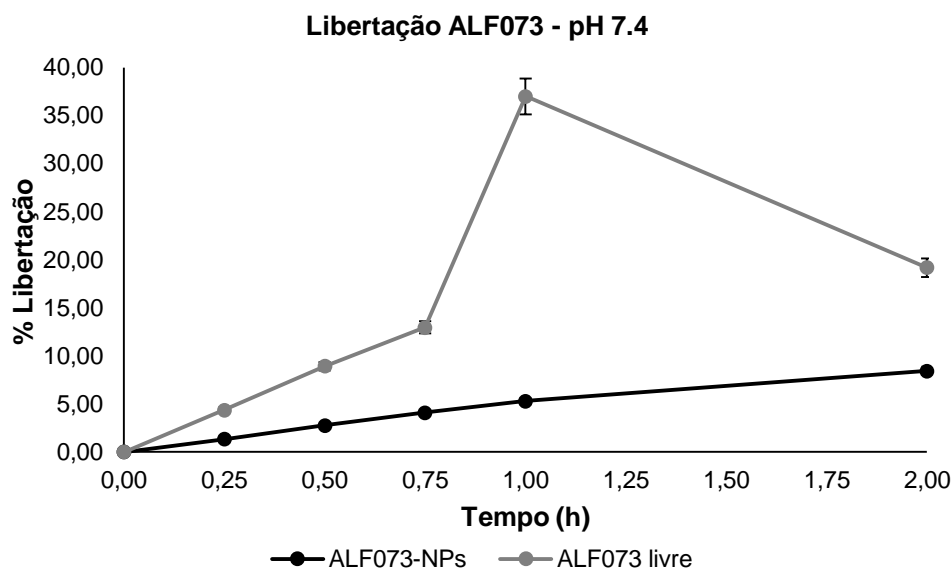
Pela análise dos resultados obtidos para os estudos com CORM-2-NPs, conclui-se que a libertação do CORM-2 é mais lenta e controlada com a utilização das NPs do que na solução de composto livre. Verifica-se também que as mudanças de pH não alteram de forma significativa a libertação do CORM-2 pelo que se pode concluir que as NPs desenvolvidas são resistentes ao pH.

Os resultados seguintes dizem respeito aos estudos de liberação *in vitro* dos restantes CORMs (ALF073, ALF153 e ALF157), onde apenas o pH fisiológico foi estudado, pelos motivos já referidos. Tendo em conta que todo o processo já se encontrava otimizado para as NPs com a superfície funcionalizada, os estudos de liberação destes compostos foram levados a cabo com a utilização do DPPE-HA na síntese das NPs.

Na figura 4.10 encontram-se representados os resultados obtidos para os estudos de liberação do ALF073. Aqui verifica-se que a libertação em ALF073-NPs é mais controlada que a libertação na solução de composto livre, à semelhança do que acontecia nos casos anteriores. Verifica-se também que há uma queda relativamente acentuada da taxa de libertação para o ALF073 livre.

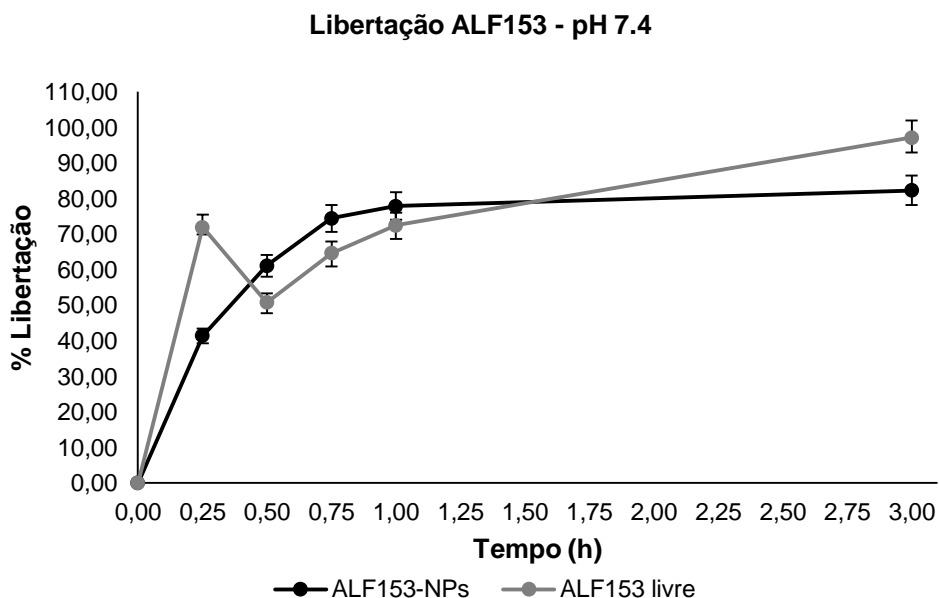
Tal como acontece com o CORM-2, a libertação em ALF073-NPs é controlada pelo que este seria um bom candidato para o presente estudo.





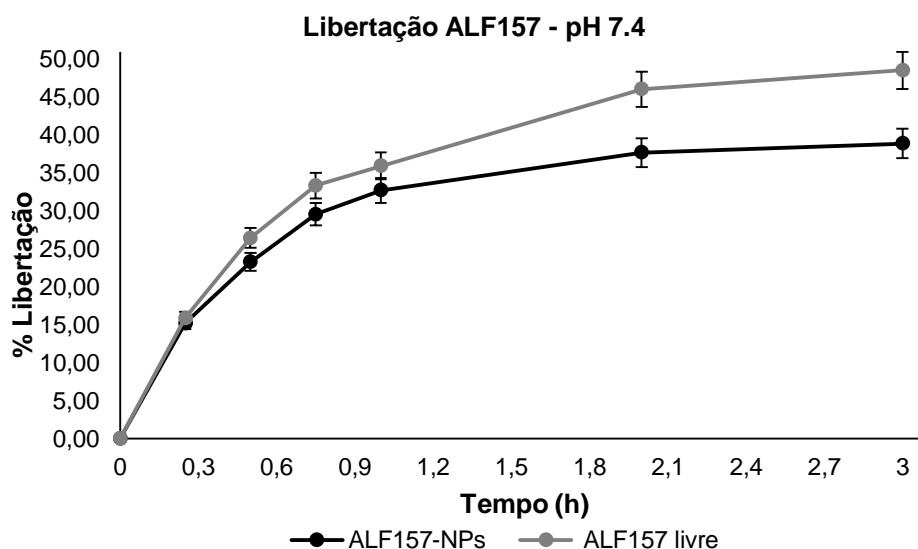
**Figura 4.10:** Representação gráfica dos estudos de liberação *in vitro* do ALF073, utilizando NPs com a superfície funcionalizada e membranas de diálise T1, a pH 7.4.

Os estudos de liberação com ALF153, representados na figura 4.11, mostram que inicialmente a liberação em ALF153-NPs é mais lenta que na solução de ALF153 livre, no entanto estes valores são rapidamente invertidos verificando-se a partir daí que as duas taxas de liberação tomam valores muito próximos. Desta forma, conclui-se que ALF153-NPs não apresenta um perfil adequado para o projeto desenvolvido e que outras formulações utilizando outros agentes para funcionalizar a superfície da nanopartícula que não o DPPE-HA deveriam ser testadas.



**Figura 4.11:** Representação gráfica dos estudos de liberação *in vitro* do ALF153, utilizando NPs com a superfície funcionalizada e membranas de diálise T1, a pH 7.4.

Os resultados obtidos para o ALF157 (Figura 4.12), à semelhança do que acontece com o ALF153 também não apresentam um perfil que seja o mais adequado para o projeto em estudo, visto que, a taxa de libertação do ALF157 nas NPs e em solução livre não apresentam diferenças que sejam significativas para considerar que a libertação do ALF157 nas NPs seja lenta e controlada de modo a justificar a utilização destas formulações no presente projeto.



**Figura 4.12:** Representação gráfica dos estudos de libertação *in vitro* do ALF157, utilizando NPs com a superfície funcionalizada e membranas de diálise T1, a pH 7,4.

Os estudos de libertação *in vitro* apresentados mostram que o CORM-2 e o ALF073 são os compostos que apresentam maior potencial de aplicação no projeto em estudo visto serem os que apresentam melhores resultados de libertação quando aliados à nanotecnologia.

Como referido no início da secção, o ALF073 trata-se de um composto não comercial o que dificulta todo o processo de otimização dos estudos visto não haver disponível a quantidade necessária para que tal seja possível. Por este mesmo motivo, não são apresentados estudos de libertação a diferentes valores de pH, o que seria necessário para mostrar se as NPs, à semelhança do que acontece com o CORM-2, resistem às variações de pH mantendo assim a libertação do CORM lenta e controlada, sendo estes estudos de particular importância principalmente se for pretendida uma via de administração oral.

Em todos os casos a obtenção das NPs foi realizada utilizando o DPPE-HA para funcionalizar a superfície das NPs. Em CORM-2-NPs verificou-se que a utilização deste conjugado era crucial para obter uma libertação controlado do CORM-2 devido à barreira hidrofílica que se forma na superfície da nanopartícula. Assim, seguiu-se o mesmo método para os restantes CORMs. No ALF073, verificamos que perfil de libertação era semelhante ao do CORM-2, nos restantes, serão necessários mais estudos e talvez estudar outros métodos de funcionalização dado que os CORMs não responderam da mesma maneira.

Embora os resultados sejam encorajadores, será ainda necessário repetir alguns dos ensaios para garantir que efetivamente os resultados obtidos correspondem aos perfis de libertação certos.

## 4.4 CINÉTICA DE LIBERTAÇÃO

Os dados de libertação do CORM-2 obtidos foram ajustados a diferentes modelos, incluindo equações de ordem zero e de primeira ordem, modelos de Hixcon-Crowell, Higuchi e Korsmeyer-Peppas para analisar o mecanismo de libertação de CORM-2 e a cinética de difusão. O ajuste de cada modelo foi avaliado com base nos valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtidos. O  $R^2$  e as constantes da taxa de libertação ( $k$ ) obtidas para cada ajuste são apresentados na tabela 7.1, anexo 7.6. Estes estudos foram apenas realizados para os casos em que se utilizou a funcionalização da superfície das NPs com DPPE-HA, uma vez que, eram os que apresentavam resultados passíveis de serem usados na finalidade pretendida.

Pela análise dos valores obtidos para  $R^2$  verifica-se que o modelo matemático que melhor se aplica a todos os casos é o de Korsmeyer-Peppas. No caso de CORM-2-NPs a pH 5.0, verifica-se que os valores de  $R^2$  obtido para os modelos de ordem zero, de Hixcon-Crowell e de Korsmeyer-Peppas são muito semelhantes o que suscita dúvidas em qual o mecanismo que se aplica neste caso. Contudo, tendo em conta que todos os outros casos seguem o modelo de Korsmeyer-Peppas, acredita-se que este caso não seja exceção.

Embora sigam o mesmo modelo, são três os meios de libertação que se conclui ocorrerem. Em CORM-2-NPs a pH 7.4 e 1.6, e em ALF153 e ALF157 a libertação ocorre por difusão de Fickian. No caso de CORM-NPs a pH 6.5 ocorre por difusão anómala (não-Fickian), em CORM-2-NPs a pH 5.0 e em ALF073 ocorre por transporte de caso-II.

A libertação por difusão de Fickian ocorre pela difusão molecular usual do fármaco devido a um gradiente de potencial químico. Na difusão anómala ocorre libertação quer devido à erosão quer devido à difusão. No caso da libertação por transporte de caso-II o mecanismo está associado a tensões e transições de estado em polímeros vítreos hidrofílicos que incham em água ou fluidos biológicos.

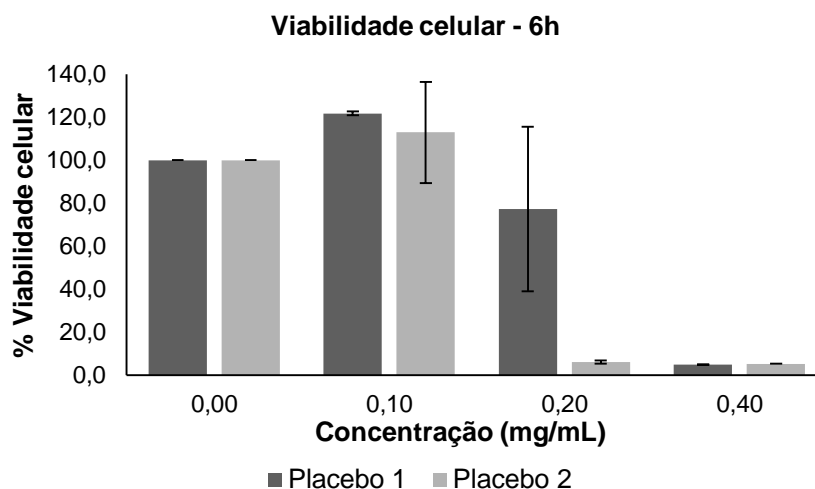
Em CORM-2-NPs taxa da libertação é mais ou menos semelhante em todos os casos, exceto a pH 5.0 onde é significativamente mais lenta. Comparando todos os valores obtidos para o pH 7.4, verifica-se que a taxa de libertação é mais elevada para qualquer um dos ALFs-NPs, sendo que os valores mais elevado se encontra em ALF153-NPs.

## 4.5 ENSAIOS COM LINHAS CELULARES

### 4.5.1 Avaliação da toxicidade

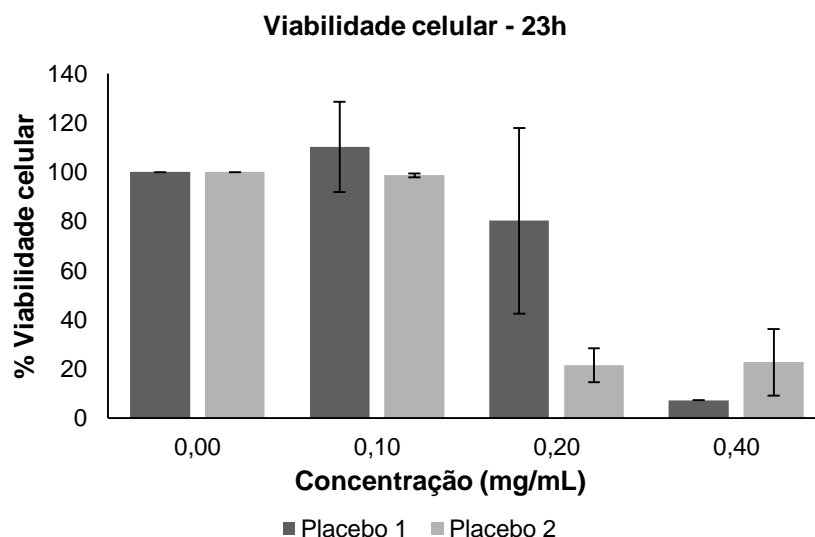
Numa primeira abordagem, foram testadas diferentes concentrações formulações placebo (NPs sem CORM) para determinar a concentração máxima de NPs que não era tóxica para as células. Estes estudos permitiram também proceder a otimizações sobre o tempo de exposição com a solução de resazurina (Figura 4.13 e figura 4.14). Nestes estudos utilizaram-se formulações produzidas no dia do ensaio (placebo 1) e formulações produzidas anteriormente

(placebo 2) de modo a avaliar se o tempo a que as NPs tinha sido produzidas tinha efeitos sobre a viabilidade da linha celular em estudo.



**Figura 4.13:** Representação gráfica da viabilidade celular dos estudos efetuados com a linha celular THP1 ao fim de 6h, usando diferentes concentrações de formulações placebo, onde o placebo 1 representa uma formulação placebo produzida no dia do ensaio e o placebo 2 representa uma formulação placebo antiga (os valores representam a média e o desvio padrão de um  $n=2$ ).

Após a medição da fluorescência no final das 6 h, deixou-se *overnight* para garantir que toda a resazurina era metabolizada. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 4.15.



**Figura 4.14:** Representação gráfica da viabilidade celular dos estudos efetuados com a linha celular THP1 ao fim de 6h, usando diferentes concentrações de formulações placebo, onde o placebo 1 representa uma formulação placebo produzida no dia do ensaio e o placebo 2 representa uma formulação placebo antiga (os valores representam a média e o desvio padrão de um  $n=2$ ).

Pela análise dos resultados obtidos, onde foram testadas as concentrações de 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL, podemos concluir que é seguro utilizar uma concentração de pelo menos 0,2 mg/mL de placebo uma vez que esta se traduz numa taxa de viabilidade celular

de cerca de 82%. Para concentrações mais elevadas (0,4 mg/mL) as NPs placebo desenvolvida já apresentam toxicidade associada. Conclui-se ainda, que de uma maneira geral, o placebo mais antigo (armazenado por 3 semanas) altera-se e torna-se tóxico para a linha celular.

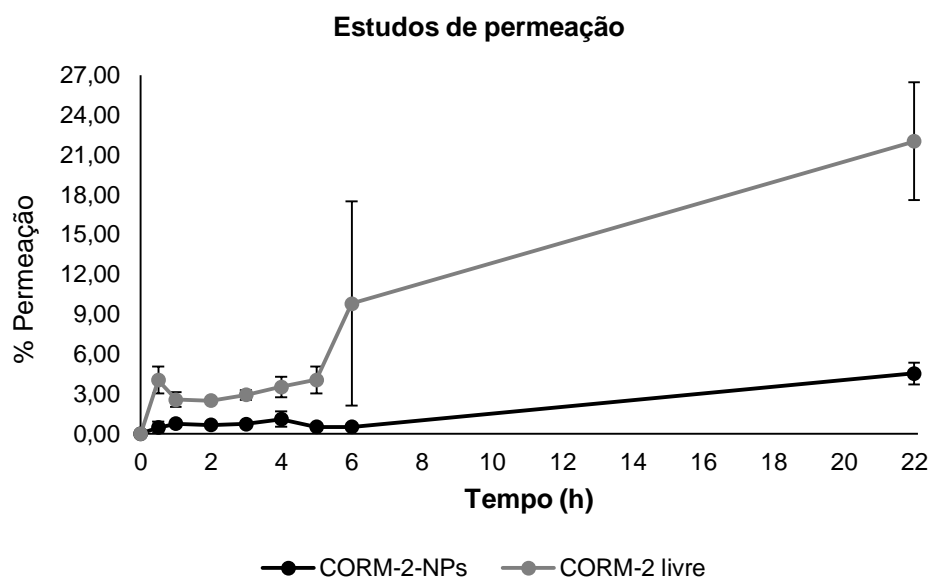
Em relação ao tempo de incubação com a resazurina, as diferenças entre as 6 h e as 23 h não são significativas pelo que 6 h de contato será o tempo ótimo de incubação.

Determinada assim a concentração máxima de NPs placebo que traduzem viabilidade celulares é necessário efetuar estudos com o CORM-2-NPs e CORM-2 livre. Estes estudos não foram realizados por falta de tempo, do mesmo modo os estudos de resposta anti-inflamatória também não foram realizados.

## 4.6 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO

Uma vez estudado o perfil de libertação *in vitro* efetuaram-se estudos de permeação de modo a avaliar qual a melhor via de administração das formulações desenvolvidas.

Estes estudos mostram em CORM-2-NPs a permeação é mais lenta e controlada do que quando se utiliza a solução de CORM-2 livre, como representado na figura 4.15. De acordo com os resultados obtidos é viável que as formulações desenvolvidas possam adquirir a forma de creme que venha a ser aplicado nas articulações afetadas facilitando a forma de administração pelo paciente e aumentado a rapidez com que o efeito terapêutico é alcançado. Sendo de salientar que será necessário, ainda assim, a realização dos estudos de toxicidade e de resposta inflamatória.



**Figura 4.15:** Representação gráfica dos resultados obtidos através dos estudos de permeação *in vitro*. Como barreira de permeação foi utilizada pele da orelha de porco, pH 7.4 e uma temperatura de 32°C.

A variação da taxa de permeação obtida é influenciada pela amostra de pele que se utiliza, visto que, a camada de gordura na parte interna da pele (parte da membrana que vai estar

em contacto com a câmara recetora) não se apresenta homogénea de amostra para amostra, verificando-se que há amostra que absorvem mais que outras pelo que se verificam oscilações entre as diferentes amostras testadas. Assim, com o decorrer do tempo surge a necessidade de acertar o volume na câmara recetora pelo que se verificam oscilações nas medições da taxa de permeação.

Verifica-se que a percentagem de fármaco que permeia a camada de pele no final do estudo é bastante baixa, o que indica que as nanopartículas desenvolvidas têm pouca capacidade de a atravessar, o que dificulta a sua utilização se se pensar numa aplicação tópica. Uma forma de resolver este problema seria utilizar um hidrogel onde as NPs seriam incorporadas.

O hidrogel iria promover um aumento da permeação de CORM-2-NPs através da camada da pele. Uma vez transposta esta barreira CORM-2-NPs seria direcionada para os tecidos sinoviais devido à presença do ácido hialurónico à superfície da nanopartícula. Assim, seria necessária uma menor quantidade de CORM-2-NPs para exercer o mesmo efeito terapêutico.



## **5 CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**

---



Não existe ainda um consenso sobre qual a melhor estratégia de tratamento para a AR. Por um lado, há quem defenda que todos os pacientes deveriam iniciar o tratamento com fármacos mais potentes e ir reduzindo à medida que se alcança a remissão da doença. Por outro lado, defende-se que se consegue uma boa resposta ao tratamento com combinações de DMARDs, não sendo necessário um tratamento inicial tão agressivo.

Contudo, estudos mostram que um tratamento inicial agressivo, o mais precoce quanto possível, conduz a uma diminuição da progressão radiográfica da doença a longo prazo. Será isto suficiente?

A chave para o tratamento eficaz dos pacientes com AR passará por um diagnóstico rápido e acertado, pelo tratamento precoce e intensivo e pela monitorização apertada da atividade da doença.

A ciência procura todos os dias arranjar formas mais viáveis de contornar estes problemas, quer seja a procura de marcadores característicos do desenvolvimento da doença, pelo desenvolver de novas técnicas de análise que permitam a identificação precoce do desenvolver da patologia, quer seja pela procura de novos tratamentos farmacológicos que visam retardar o avançar da doença, e quiçá, retardar o aparecimento da mesma, quer por outro lado, procurar minimizar os efeitos colaterais associados aos tratamentos já existentes.

A descoberta dos efeitos anti-inflamatórios do CO poderá ajudar a desenvolver novos fármacos que sejam eficazes nesta patologia. Nesse sentido, e aliado às vantagens da nanotecnologia, desenvolveu-se o presente trabalho. O objetivo era desenvolver nanoagentes que fossem capazes de fornecer CO a locais alvo de modo a aliar a inflamação presente nos doentes com AR.

Ao longo do trabalho, mostrou-se que as formulações desenvolvidas eram capazes de libertar CO de forma controlada, isto pode ser claramente comprovado pelos estudos de libertação *in vitro* e pelos estudos de permeação *in vitro*. É evidente que a funcionalização da superfície das NPs com DPPE-HA trouxe vantagens, uma vez que apenas com esta estratégia se conseguiu alcançar o primeiro dos objetivos. A barreira hidrofílica que se forma com a utilização deste conjugado dificulta a capacidade dos CORMs atravessarem a superfície da nanopartícula, impossibilitando também que estes tenham oportunidade de se alojar na superfície da nanopartícula o que faria com que a sua libertação fosse mais rápida. Assim, a funcionalização da superfície das NPs tornou-se essencial.

Verifica-se que a libertação de CORM-2 na presença de NPs com a superfície funcionalizada com DPPE-HA continua a ser controlada quando se faz variar o valor do pH. Os estudos realizados evidenciam que as NPs produzidas seriam capazes de atravessar o trato gastrointestinal sem se degradarem, o que indica que uma administração oral poderá ser o método mais adequado para administrar as formulações desenvolvidas.

Os estudos de libertação *in vitro* mostram ainda que o ALF073 é o que apresenta um perfil que mais adequado ao objetivo do trabalho, visto que, dentro dos CORMs não comerciais foi o único onde se conseguiu alcançar uma libertação mais lenta em CORM-NPs quando comparada

com a libertação do respetivo CORM em solução livre. Contudo, será necessário repetir e otimizar os estudos referentes a este CORM.

Com a realização dos estudos com a linha celular THP1 mostra-se ainda que as formulações placebo não apresentam toxicidade até uma concentração de 0,2 mg/mL. Posteriormente irão realizar-se os mesmos estudos com CORM-2-NPs e com CORM-2 livre de modo a avaliar a toxicidade e capacidade de resposta anti-inflamatória do composto em estudo.

Pelo TEM mostra-se ainda que a morfologia das NPs é mantida ao longo do tempo, o que poderá indicar que o candidato a fármaco (CORM-2) não está a ser expulso das NPs. Os estudos de estabilidade mostram que as NPs desenvolvidas mantêm um tamanho estável até às 6 semanas com a exceção das NPs onde a superfície não foi funcionalizada com o DPPE-HA. Na taxa de encapsulação verifica-se que CORM-2-NPs + DPPE-HA mantêm a estabilidade durante 5 semanas e CORM-2-NPs sem funcionalização durante 6 semanas. O índice de polidispersão e o potencial zeta mantêm-se estáveis até às 6 semanas.

Relativamente aos estudos da cinética de libertação concluímos que todas as formulações estudadas seguem o modelo matemático de Korsmeyer–Peppas, onde ALF157-NPs apresenta uma taxa de libertação mais elevada. Dentro dos CORM-2-NPs, a diferença mais significativa é a pH 5.0 onde a taxa de libertação é significativamente mais baixa.

Os estudos de permeação mostram ainda que, efetivamente se conseguem uma permeação controlada em CORM-2-NPs quando se compara com a permeação do CORM-2 livre. Porém, a taxa máxima de permeação que se conseguiu obter foi de aproximadamente 4%, o que indica que pouco CORM-2 chegaria ao destino pretendido – as articulações inflamadas – pelo que será necessário estudar estratégias que permitam melhorar os resultados obtidos.

Estes estudos permitiram identificar que o CORM-2 é libertado de CORM-2-NPs. No entanto, não temos informação nenhuma acerca do CO que o CORM ainda poderá ter na sua constituição durante o tempo dos ensaios. Sabemos que, o que vai elicitar um efeito é o CO e não o metal à qual está ligado. Esses ensaios exigem equipamento que de momento não está disponível. De qualquer forma, e sabendo que um dos principais problemas destes compostos é a sua instabilidade em meios fisiológicos, os resultados mostram que o CORM, com ou sem CO, se mantém dentro das NPs, o que pode retardar a libertação do CO para a zona de interesse.

Como trabalhos futuros, será do maior interesse avaliar a resposta anti-inflamatória do CORM-2 e de CORM-2-NPs quer em linhas celulares como posteriormente *in vivo*. A exploração da funcionalização da superfície das NPs será também uma abordagem interessante, onde se podem obter melhores resultados de direcionamento e por conseguinte melhores resultados na redução da inflamação. Estudar novas estratégias de armazenamentos será também um trabalho necessário de modo a conseguir que as formulações desenvolvidas mantenham a estabilidade pelo máximo de tempo possível. Será ainda crucial obter informações sobre a presença do CO durante o tempo dos estudos.

Recorrer a métodos que promovam uma libertação controlada de fármacos será, com certeza, uma aposta favorável, não só no que diz respeito à AR como a tantos outros problemas de saúde tanto ou mais incapacitantes que esta patologia



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- [1] Antunes, I.B.S.; **Artrite Reumatóide – Intervenção Farmacológica e Crenoterápica**. PhD Thesis; 2015; Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.
- [2] McPhee, S.J.; Ganag, W.F.; **Fisiopatologia da Doença: Uma Introdução à Medicina Clínica**. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2007; pp.586-588.
- [3] Silman, A.J.; Pearson, J.E., **Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis**. Arthritis Research & Therapy.; 2002; 4 Suppl 3:S265-72; Epub 2002 May 9.
- [4] Adebajo A., **ABC of Rheumatology**. 4th Edition, 2010, BMJ Books, 2010, ISBN 978-1-4051-7068-0.
- [5] Sociedade Portuguesa de Reumatologia: **Doenças: Artrite Reumatoide – Manual informativo**. Disponível na Internet: [www.spreumatologia.pt/doencas/artrite-reumatoide/manual-informativo/146](http://www.spreumatologia.pt/doencas/artrite-reumatoide/manual-informativo/146) (acedido a 6 de Abril de 2018).
- [6] Hitchon, C.A.; Peschken, C.A.; Shaikh, S.; El-Gabalawy, H.S.; **Early undifferentiated arthritis**. Rheumatic Disease Clinics of North America; 2005 Nov.; 31(4):605-26.
- [7] Abreu M.I.P.C., **Avaliação e tratamento precoces na Artrite Reumatóide: impacto no prognóstico**. Monografia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2012.
- [8] Rantapää-Dahlqvist, S.; Jong, B.A; Berglin, E.; Hallmans, G.; Wadell, G.; Stenlund, H.; et al; **Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis**. Arthritis & Rheumatism.; 2003 Oct.; 48(10):2741-9.
- [9] Fonseca, J.E.C.; **Artrite Reumatóide: diagnosticar precocemente com o objetivo de induzir a remissão clínica**. Boletim Informativo da Sociedade Portuguesa de Reumatologia; Nº7; Janeiro a Abril de 2010; pg. 12-14.
- [10] Kourilovitch M., Galarza-Maldonado C., Ortiz-Prado E., **Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis**. Journal o Autoimmunity 48-49 (2014) 26-30.
- [11] Monteiro A.A.C.P., **Artrite Reumatoide: Impacto da terapêutica com agentes biológicos nos parâmetros clínicos e laboratoriais**. MsC Thesis, Universidade da Beira Interior, 2013.
- [12] Burmester G.R., Pope J.E., **Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis**. The Lancet 2017; 389:2338-48.
- [13] Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A.; Funovits, D.; Bingham, C.; et al; **Arthritis & Rheumatism: 2010 rheumatoid arthritis classification criteria**. 2010; An American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism Collaborative Initiative; American College of Rheumatology; 62; 2569-2581.
- [14] American College of Rheumatology; **Guidelines for the management of rheumatoid arthritis**. 2002; Arthritis & Rheumatism; 46(2):328-346.
- [15] Boutry, N.; Morel, M.; Flipo, R.M.; et al; **Early rheumatoid arthritis: A review of MRI and sonographic findings**. American Journal of Roentgenology; 2007; 189:1502-1509.
- [16] Sociedade Portuguesa de Reumatologia; **Doenças: Artrite Reumatoide – O que é?**. Disponível na Internet: <http://www.spreumatologia.pt/doencas/artrite-reumatoide> (acedido a 29 de Agosto de 2017).
- [17] Waldburger, J.M.; Firestein, G.S.; **Rheumatoid Arthritis Epidemiology, Pathology and Pathogenesis**. 2008; In: Klippel, J.H.; Stone, J.H.; Crofford, L.J.; White, P.H.; “Primer on the Rheumatic Diseases”; 13th Edition; United States of America: Springer; pp. 122-131.
- [18] Dubey, S.; Adebajo, A.O.; **Historical and Current Perspectives on Management of Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis**. 2008; In: “Reid D.M.; Miller, C.G.; Clinical Trials in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. London: Springer, pp. 12-26.
- [19] Yasuda, L.; **Rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and fibromyalgia**. 2008; In: Radomski, M.V. & Latham, C.T.; **Occupational therapy for physical dysfunction**. 6th Edition; Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; pp. 1214-1243.
- [20] Tehlirian, C.V.; Bathon, J.M.; **Rheumatoid Arthritis Clinical and Laboratory Manifestations**. 2008; In: “Klippel, J.H.; Stone, J.H.; Crofford, L.J.; White, P.H.; “Primer on the Rheumatic Diseases”; 13th Edition; USA: Springer; pp.114-121.
- [21] Nishimura, K.; Sugiyama, D.; Kogata Y.; Tsuji, G.; Nakazawa, T.; Kawano, S.; et al; **Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis**. Annals of Internal Medicine; 2007; 146(11):797-808.

- [22] Gonçalves, T.M.S.; **Investigação Clínica de Medicamentos Biológicos no Tratamento da Artrite Reumatóide**. MSc Thesis; 2013; Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; Coimbra.
- [23] Brenol C.V., Monticeli O.A., Xavier R.M., Brenol J.C.T., **ARTRITE REUMATÓIDE E ATEROSCLEROSE**. Revista da Associação Médica Brasileira; 2007; 53(5): 465-70.
- [24] Rego C.M., **Artrite Reumatóide Fisiopatologia e Terapêutica biológica**. MsC thesis, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, 2010.
- [25] Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.A., **Rheumatoid arthritis**, The Lancet 2016; 388: 2023-38.
- [26] Gibofsky A. **Combination Therapy for Rheumatoid Arthritis in the Era of Biologicals**. The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special surgery. 2006;2(1):30-41. doi:10.1007/s11420-005-0133-z.
- [27] Sociedade Portuguesa de Reumatologia; **Doenças: Artrite Reumatoide – Como se trata?**. Disponível na Internet: <http://www.spreumatologia.pt/doencas/artrite-reumatoide/como-se-trata-170> (acedido a 4 de Outubro de 2017).
- [28] Boletim informativo da apifarma: **DIA NACIONAL DO DOENTE COM ARTRITE REUMATOIDE**. 2010. Disponível na internet: <http://www.apifarma.pt/publicacoes/factsheetsAD/Paginas/AR5Abr.aspx> (acedido a 10 de Outubro de 2017).
- [29] Badri w., Milaki K., Nazari QA, Greige-Gerges H., Fessi H., Elaissari A., **Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects**. International journal of Pharmaceutics 515 (2016) 757-773.
- [30] Kumar P., Banik S., **Pharmacotherapy Options in Rheumatoid Arthritis.**, Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders 2013;6 35-43.
- [31] Azevedo, M.; **Nanoesferas e Libertação Controlada de Fármacos**. Monografia; 2002; Instituto de Química UNICAMP.
- [32] Crofford L.J., **Use of NSAIDs in treating patients with arthritis**. Crofford Arthritis Research & Therapy 2013, 15(Suppl 3):S2.
- [33] Townsend H.B., Saag K.G., **Glucocorticoid use in rheumatoid arthritis: Benefits, mechanisms, and risks**. Clinical and Experimental Rheumatology 2004; 22 (Suppl. 35): S77-S82.
- [34] Vandewalle J., Luybaert A., Bosscher K., Libert C., **Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids**. Trends in Endocrinology & Metabolism, January 2018, Vol. 29, No. 1
- [35] Prosperi D., Colombo M., Zanoni I., Cranucci F., **Drug nanocarriers to treat autoimmunity and chronic inflammatory diseases**. Seminars In Immunology, 2017, Vol. 34, pages 61-67.
- [36] Faraji A.H., Wipf P., **Nanoparticles in cellular drug delivery**. Bioorganic & Medicinal Chemistry 17 (2009) 2950-2962.
- [37] Kahlenberg J.M., Fox D.A., **Advances in the Medical Treatment of Rheumatoid Arthritis**. Hand Clinics 2011 February; 27(1): 11-20.
- [38] Dolati S., Sadreddini S., Rostamzadeh D., et al, **Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis**. Biomedicine & pharmacotherapy 80 (2016) 30-41.
- [39] Yeganeh M.H., Kheir M.M., Shadi A., Parvizi J., **Rheumatoid Arthritis, Disease Modifying Agents, and Periprosthetic Joint Infection: What Does A Joint Surgeon Need to Know?**. The Journal of Arthroplasty, 2018 Apr;33(4): 1258-1264.
- [40] Burmester G.R., et al., **Treatment efficacy and methotrexate-related toxicity in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate in combination with adalimumab**. Rheumatic & Musculoskeletal Diseases, 2017;3:e000465.
- [41] Albrecht K., Müller-Ladner U., **Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis**. Clinical and Experimental Rheumatology; 2010; 28(Suppl. 61). S95-S101.
- [42] Vollenhoven R.F., **New therapeutic approaches in rheumatoid arthritis**. La Presse Médicale. 2016; 45: e179-e192.
- [43] Azevedo V.F., Troiano L.D.C., Galli N.B., Catolino N.M., Martins P.C.U.; **Adalimumab: a review of the reference product and biosimilars**. Biosimilars; 26 July 2016 Volume 2016:6 Pages 29-44.
- [44] Goel N., Chance K., **Biosimilars in rheumatology: understanding the rigor of their development**. Rheumatology; 2017;56:187-197.

- [45] Knauert M., Vangala S., Haslip M., Lee P.J., **Therapeutic Applications of Carbon Monoxide**. Oxidative medicine and Cellular Longevity, Volume 2013, Article ID 360815, 11 pages.
- [46] Romão C.C., Blättler W.A., Seixas J.D., Bernardes G.J.L., **Developing drug molecules for therapy with carbon monoxide**. Chemical Society Reviews, 2012, 41, 3571-3583.
- [47] Otterbein L.E., **The Evolution of Carbon Monoxide Into Medicine**. Respiratory Care, July 2009, Vol. 54, No. 7.
- [48] Wu L., Wang R., **Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications**. Pharmacological Reviews, 2005, Vol. 57, No.4, pages 585-630.
- [49] Qereshi O.S., et al., **Enhanced acute anti-inflammatory effects of CORM-2-loaded nanoparticles via sustained carbon monoxide delivery**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016 Vol. 108, pages 189-195.
- [50] Rochette L., Cottin Y., Zeller M., Vergely C., **Carbon monoxide: mechanisms of action and potential clinical implications**. Pharmacology & Therapeutics, 2013 Vol.137, pages 133-152.
- [51] Ling K., Men F., Wang W.C., Zhou Y.Q., Zhang H.W., Ye D.W., **Carbon Monoxide and Its Controlled Release: Therapeutic Application, Detection, and Development of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs)**. Journal of Medicinal Chemistry, 2018, Vol. 61, pages 2611-2635.
- [52] Marhenke J., Trevino K., Works C., **The chemistry, biology and design of photochemical CO releasing molecules and the efforts to detect CO for biological applications**. Coordination Chemistry Reviews 306(2016)53-543.
- [53] Santos-Silva T., Mukhopadhyay A., Seixas J.D., Bernardes G.J.L., Romão C.C., Romão M.J., **Towards Improved Therapeutics CORMs: Understanding the Reactivity of CORM-3 with Proteins**. Current Medicinal Chemistry, 2011 Vol. 18, No.2.
- [54] Motterlini R., **Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities**. Biochemical Society Transactions (2007) Volume 35, part 5.
- [55] Steiger C., Hermann C., Meinel L., **Localized delivery of carbon monoxide**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 118 (2017) 3-12.
- [56] Fagone P., Mangano K., Coco M., Perciavalle V., Garotta G., Romao C.C., Nicoletti F.; **Therapeutic potencial of carbon monoxide in multiplr sclerosis**. Clinical and Experimental Immunology. 2012;167(2):179-187.
- [57] Kautz A.C.K., Kunz P.C., Janiak C., **CO-releasing molecule (CORM) conjugate systems**. Dalton Transactions, 2016, 45, 18045.
- [58] Seixas J.D., Mukhopadhyay A., Santos-Silva T., et al., **Characterization of a versatile organometallic pro-drug (CORM) for experimental CO based therapeutics**. Dalton Transactions, 2013, Vol. 42, pages 5985-5998.
- [59] Jaouen G., Salmain M., **Bioorganometallic Chemistry: Applications in Drug Discovery, Biocatalysis, and Imaging**. 6ºcapítulo – Metal Carbonyl Prodrugs: CO Delivery and Beyond, First Edition, 2015. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [60] Macais, N., Ferrándiz M.L., Devesa I., et al, **The CO-releasing molecule CORM-3 protects against articular degradation in the K/BxN serum transfer arthritis model**. European Journal of Pharmacology 634 (2010) 184-191.
- [61] Coimbra, P.; **Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. PhD Thesis; 2010; Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra; Coimbra.
- [62] Rodrigues, N.; **Estudo da Libertação Controlada de Fármacos por Hidrógeis de PVA/ATAPULGITA**. Projeto de graduação; 2012; Escola Politécnica; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- [63] Pires, R.; **Modelagem Matemática de Perfis de Libertação de Fármacos a Partir de Nanocarreadores**. Dissertação; 2011; Centro Universitário Franciscano de Santa Maria; Santa Maria.
- [64] Kawashima, Y.; **Preface Nanoparticulate Systems for Impoved Drug Delivery**. Advanced Drug Delivery Review.; v.1; n.47; p.1-2.
- [65] Wilczewska A.Z., et al., **Nanoparticles as drug delivery systems**. Pharmacological Reports, Vol. 64, 2012. Pages 1020-1037.

- [66] Kumar B., Jalodia K., Kumar P., Gautam H.K., **Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery**. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2017, Vol.41, pages 260-268.
- [67] Delgado J.M.F., **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa**. MsC Thesis, Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança, 2013.
- [68] Kayser, O.; Lemke, A.; Hernández-Trejo, N.; **The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems**. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2005, 6(1), 3-5.
- [69] Rawat, M.; Singh, D.; Saraf, S.; Saraf, S.; **Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs**. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(9), 1790-1798.
- [70] Couvreur P., **Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future**. Advanced Drug Delivery Review; 2013, Vol. 65, pages 21-23.
- [71] Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S.K.; **Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging**. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine; 2012; 8(2); 147-166.
- [72] Costa T.C.E., **O USO DE NANOPARTÍCULAS LIPIDICAS COMO VEÍCULOS DE FÁRMACOS**. MsC thesis, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2016.
- [73] Weissig, V.; Pettinger, T.K.; Murdock, N.; **Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market**. International Journal of Nanomedicine, 2014, 9, 4357-4373.
- [74] Singh R., Lillard J.W., **Nanoparticles-based targeted drug delivery**, Experimental and Molecular Pathology, 2009, Vol.86, pages 215-223.
- [75] Naahidi S., et al., **Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery**. Journal of Controlled Release, 2013, Vol. 166, pages 182-194.
- [76] Soni, K.; Kukreja, B.K.; Kapur, M.; Kohli, K.; **Lipid nanoparticles: Future of oral drug delivery and their current trends and regulatory issues**. International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research; 7(1); 1-18; 2015.
- [77] Jang H.L., Khademhosseini A., **Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery**, Drug Discovery Today, Vol. 22, No.9, 2017.
- [78] Natarajan J.V., Nugraha C., Ng X.W., Venkatraman S., **Sustained-release from nanocarriers: a review**. Journal of Controlled Release 193 (2014) 122-138.
- [79] Delgado J.M.F., **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa**. MsC Thesis, Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança, 2013.
- [80] Mendes M.M.F.C., **LIPID NANOPARTICLES AS A VERSATILE SYSTEM FOR DRUG ADMINISTRATION**. MsC Thesis, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2016.
- [81] Vitorino C., Sousa J., Pais A., **Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities**. Current Pharmaceutical Design, 2015, Vol.21, No.00.
- [82] Kappor B., Singh S.K., Gulati M., Gupta R., Vaidya Y., **Application of Liposomes in Treatment of Rheumatoid Arthritis: Quo Vadis**, The Scientific World Journal 2014.
- [83] Heo R., et al., **Dextran sulfate nanoparticles as a theranostic nanomedicine for rheumatoid arthritis**. Biomaterials, Vol. 131, 2017, pages 15-26.
- [84] Qureshi O.S., Zeb A., Akram M., Kim M.S., et al., **Enhanced acute anti-inflammatory effects of CORM-2-loaded nanoparticles via sustained carbon monoxide delivery**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 108 (2016) 187-195.
- [85] Gouveia V.M., Lopes-de-Araújo J., Lima S.A.C., Nunes C., Reis S., **Hyaluronic acid-conjugated pH-sensitive for targeted delivery of prednisolone on rheumatoid arthritis therapy**. Nanomedicine (Lond.) (2018) 13(9), 1037-1049.
- [86] Cosco D., et al., **Polysaccharide-coated liposomes by post-insertion of a hyaluronan-lipid conjugate**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 158(2017) 119-126.
- [87] Bhatia S., **Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication, Methods and Drug Delivery Applications**. In: "Natural Polymer Drug Delivery" pp 33-93. Springer, Cham.
- [88] Brookhaven Instruments Corporation: **Applications: Theory - Zeta Potential: What is a Zeta Potential**. Disponível na Internet:

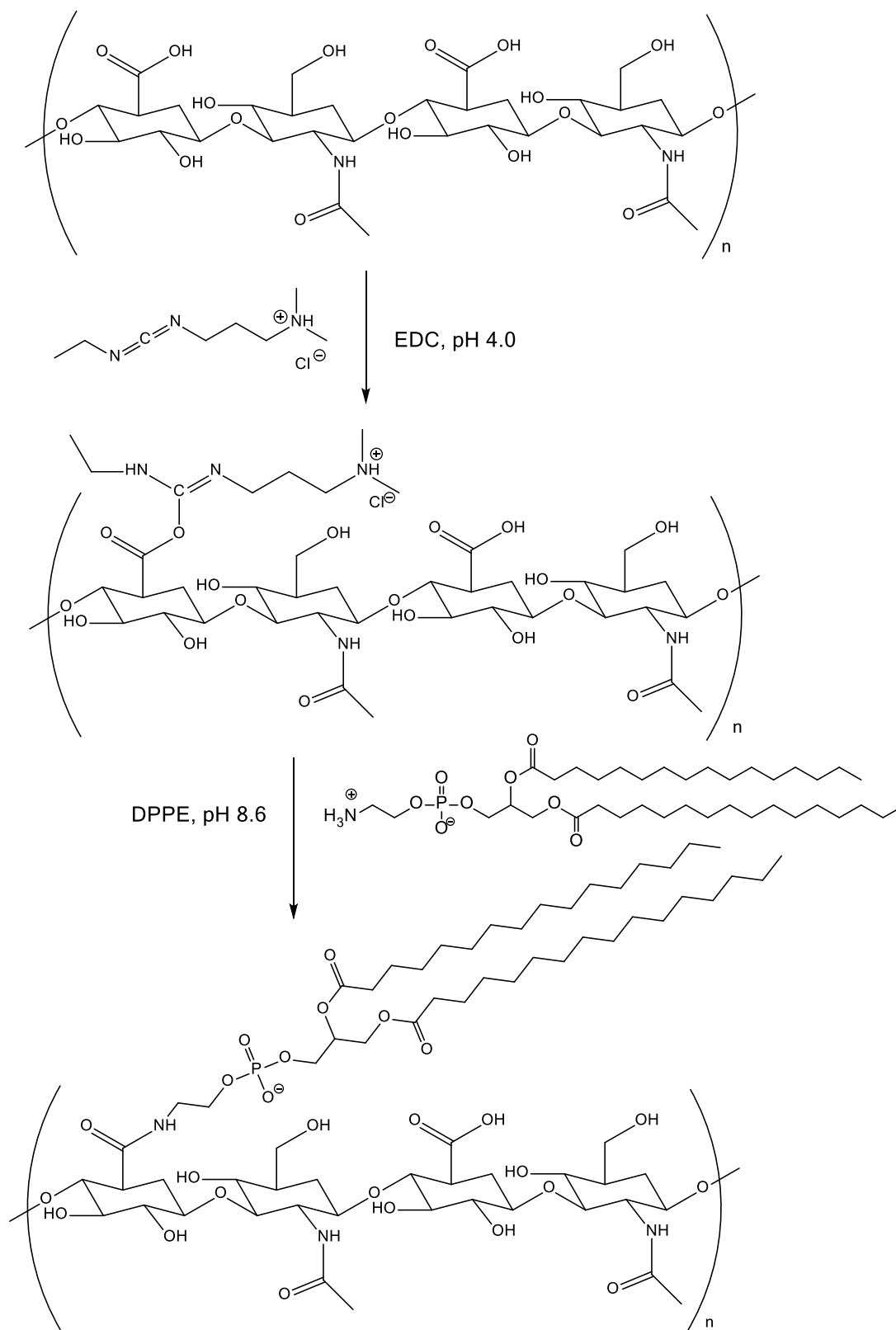


- <https://www.brookhaveninstruments.com/library/zeta-potential-analyzers/what-is-zeta-potential> (acedido a 18 de Junho de 2018).
- [89] Malvern-Instruments, **Measuring Zeta Potencial – Laser Doppler Electrophoresis**. Zetasizer Nano Technical note.
  - [90] Connah, M. and M. Kasuba, **The use of Zeta Potencial in the Pharmaceutical Industry**. Malvern Instruments.
  - [91] Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J., **THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach**. International Immunopharmacology, Vol. 23, 2014, Pages 37-45.
  - [92] Berthomieu C., Hienewadel R., **Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy**. Photosynth Res (2009) 101:157-170.
  - [93] Rampersas S., **Multiple Applacations of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays**. Sensors 2012, 12, 12347-12360.
  - [94] Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. **Cell Viability Assays**. 2013 In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
  - [95] O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F., **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity**. European Journal of Biochemistry, Vol. 267, Issue 17.
  - [96] Modi P.B., et al., **A Review Article: in Vitro Release Techniques for Topical Formulations**. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 2016;6(05).
  - [97] Lopes-de-Araújo J., Neves A.R., et al; **Oxaprozin-Loaded Lipid Nanoparticles towards Overcoming NSAIDs Side-Effects**. Pharmaceutical Research (2016) 33:301-314.
  - [98] Vieira A.C.C., Chaves L.L., et al.; **Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis**. International Journal of Pharmaceutics 536 (2018) 478-485.

## 7 ANEXOS

---

## 7.1 ESQUEMA DE SÍNTESE DO CONJUGADO DPPE-HA

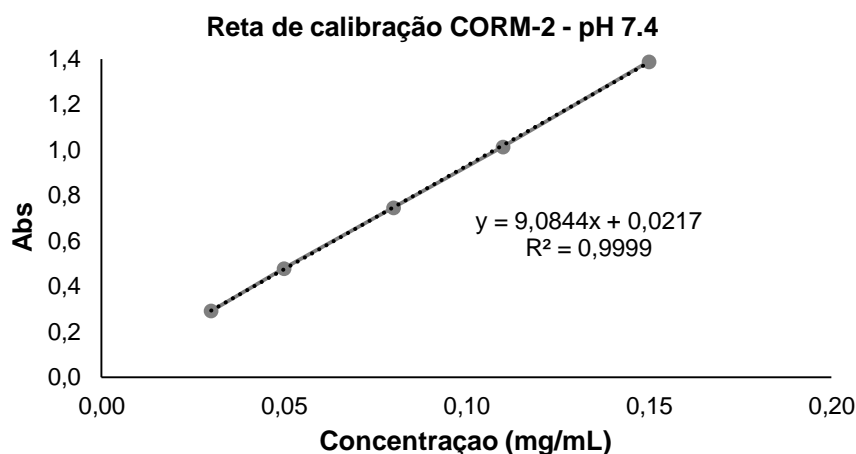


**Figura 7.1:** Representação do esquema reacional da síntese do conjugado DPPE-HA (adaptado de "Polysaccharide-coated liposomes by post-insertion of a hyaluronan-lipid conjugate" [86]).

## 7.2 RETA DE CALIBRAÇÃO DO CORM-2

### 7.2.1 Taxa de encapsulação

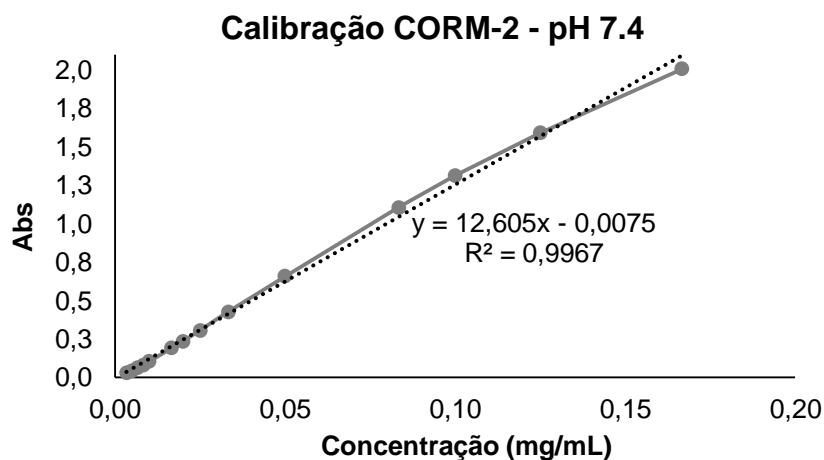
A reta de calibração para a taxa de encapsulação efetuou-se utilizando uma solução *stock* de 1mg/mL de CORM-2 em água com 5% de DMSO. Para traçar a reta de calibração efetuaram-se diluições da solução *stock* e mediu-se a absorvância entre os 200-600nm. A reta obtida encontra-se representada na figura 7.2.



**Figura 7.2:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação do CORM-2 nas NPs

### 7.2.2 Ensaios de libertação a pH 7.4

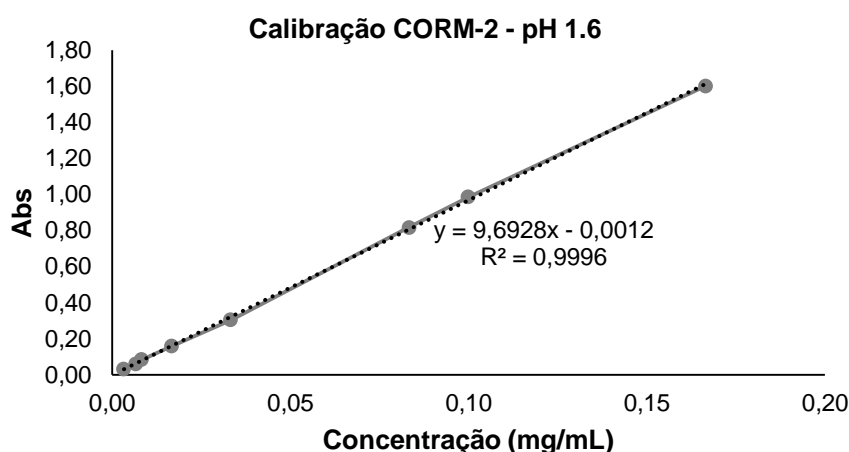
A reta de calibração do CORM-2 para os estudos de libertação a pH 7.4 efetuou-se utilizando como solução mãe a solução preparada para os estudos de libertação do CORM-2 livre. Para tal, efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 200-600nm, obtendo-se a reta representada na figura 7.3. Como branco utilizou-se uma solução de PBS com 2% de DMSO.



**Figura 7.3:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, *in vitro*, para o CORM-2 nas NPs e para o CORM-2 livre, usando como meio de diálise o PBS+2%DMSO (pH 7.4).

### 7.2.3 Ensaio de liberação com FaSSGF

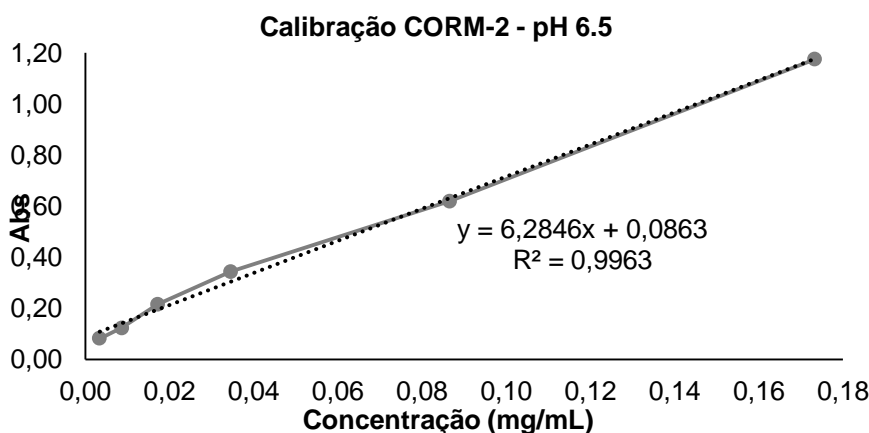
A reta de calibração para estudos de liberação com FaSSGF para simular o meio do intestino em condições de jejum efetuou-se utilizando a solução preparada para os estudos de liberação do CORM-2 livre. Para tal, efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 600-200nm, obtendo-se a reta representada na figura 7.4. Como branco utilizou-se uma solução de FaSSGF com 2% de DMSO.



**Figura 7.4:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de liberação, *in vitro*, para o CORM-2 nas NPs e para o CORM-2 livre, usando como meio de diálise FaSSGF+2%DMSO (pH 1.6).

### 7.2.4 Ensaio de liberação com FaSSIF

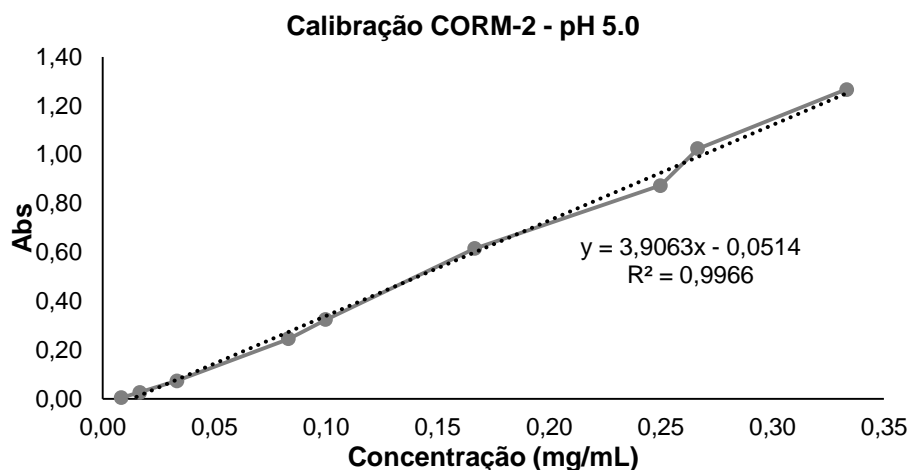
A reta de calibração para estudos de liberação com FaSSIF para simular o meio intestinal em condições de jejum efetuou-se utilizando a solução preparada para os estudos de liberação do CORM-2 livre. Para tal, efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 600-200nm, obtendo-se a reta representada na figura 7.5. Como branco utilizou-se uma solução de FaSSIF com 2% de DMSO.



**Figura 7.5:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de liberação, *in vitro*, para o CORM-2 nas NPs e para o CORM-2 livre, usando como meio de diálise FaSSIF+ 2%DMSO (pH 6.5).

## 7.2.5 Ensaio de libertação com FeSSIF

A reta de calibração para estudos de libertação com FeSSIF para simular o meio intestinal alimentado efetuou-se utilizando a solução preparada para os estudos de libertação do CORM-2 livre. Para tal, efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 600-200nm, obtendo-se a reta representada na figura 7.6. Como branco utilizou-se uma solução de FeSSIF com 2% de DMSO.

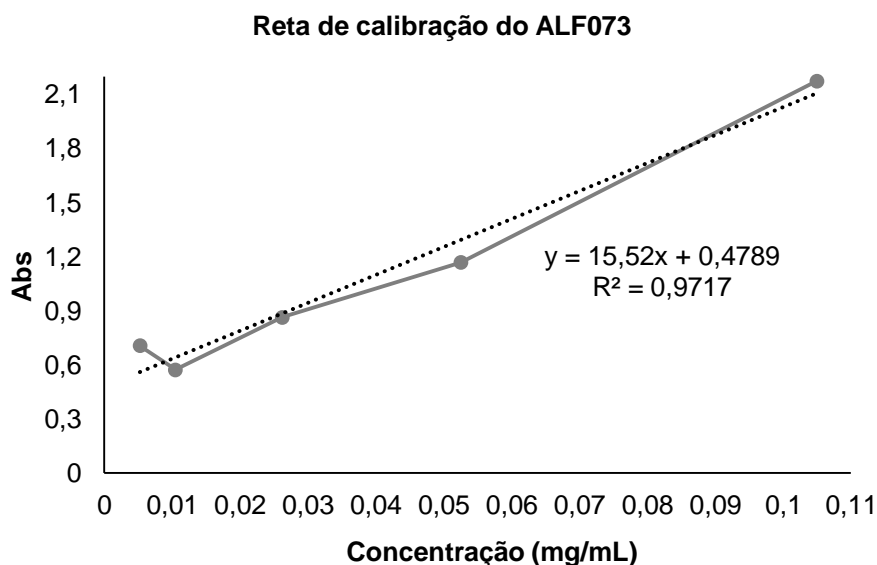


**Figura 7.6:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, *in vitro*, para o CORM-2 nas NPs e para o CORM-2 livre, usando como meio de diálise FeSSIF+2%DMSO (pH 5.0).

## 7.3 RETA DE CALIBRAÇÃO ALF073

### 7.3.1 Taxa de encapsulação

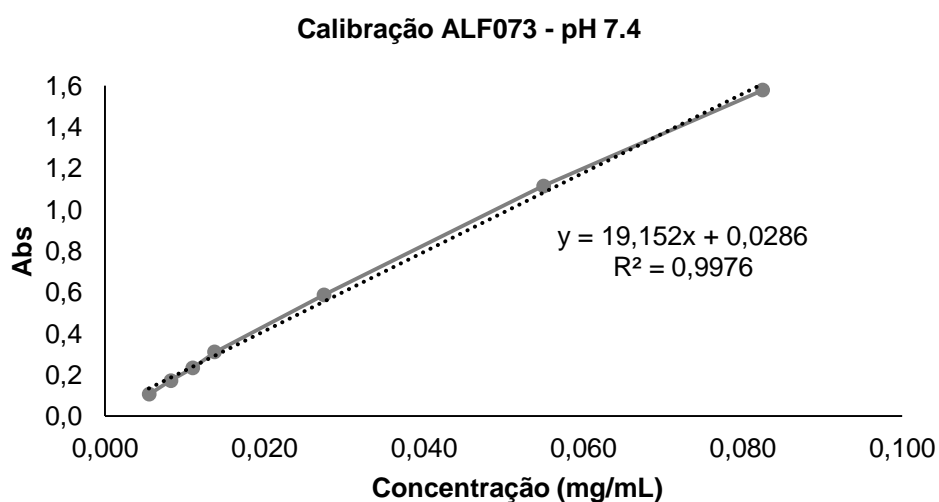
A reta de calibração para a taxa de encapsulação efetuou-se utilizando uma solução *stock* de 1mg/mL de ALF073 em água com 5% de DMSO. Para traçar a reta de calibração efetuaram-se diluições da solução *stock* e mediu-se a absorvância entre os 200-600nm. A reta obtida encontra-se representada na figura 7.7.



**Figura 7.7:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação do ALF073 nas NPs.

### 7.3.2 Estudos de libertação *in vitro*

A reta de calibração do ALF073 para os estudos de libertação a pH 7.4 efetuou-se utilizando como solução mãe a solução preparada para os estudos de libertação do ALF073 livre. Para tal, efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 200-600nm, obtendo-se a reta representada na figura 7.8. Como branco utilizou-se uma solução de PBS com 2% de DMSO.

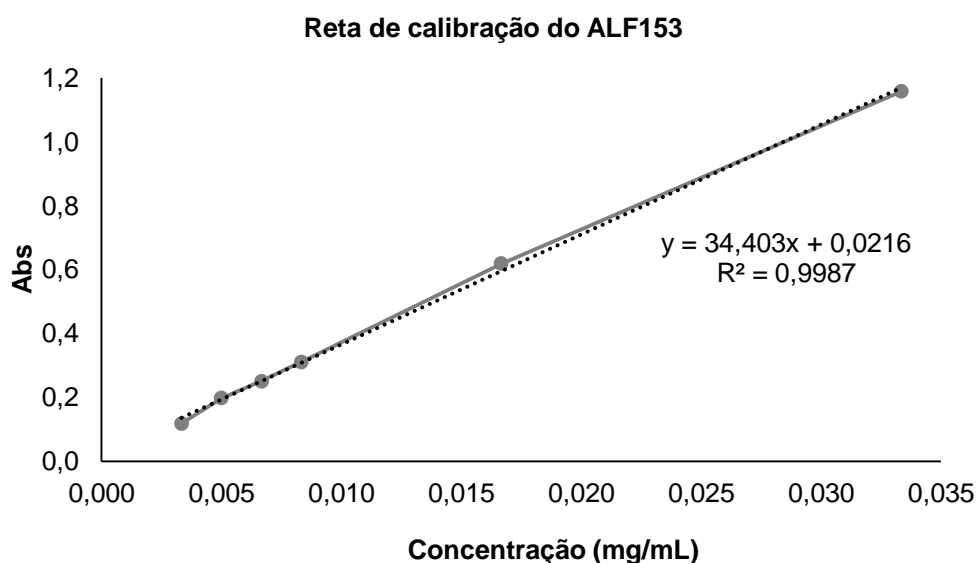


**Figura 7.8:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, *in vitro*, para o ALF073 nas NPs e para o ALF073 livre, usando como meio de diálise o PBS+2%DMSO (pH 7.4).

## 7.4 RETA DE CALIBRAÇÃO ALF153

### 7.4.1 Taxa de encapsulação

A reta de calibração para a taxa de encapsulação efetuou-se utilizando uma solução *stock* de 1mg/mL de ALF13 em água com 5% de DMSO. Para traçar a reta de calibração efetuaram-se diluições da solução *stock* e mediu-se a absorvância entre os 200-600nm. A reta obtida encontra-se representada na figura 7.9.



**Figura 7.9:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação do ALF153 nas NPs

### 7.4.2 Estudos de libertação *in vitro*

A reta de calibração do ALF153 para os estudos de libertação a pH 7.4 efetuou-se utilizando como solução mãe a solução preparada para os estudos de libertação do ALF153 livre. Para tal, efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 200-600nm, obtendo-se a reta representada na figura 7.10. Como branco utilizou-se uma solução de PBS com 2% de DMSO.



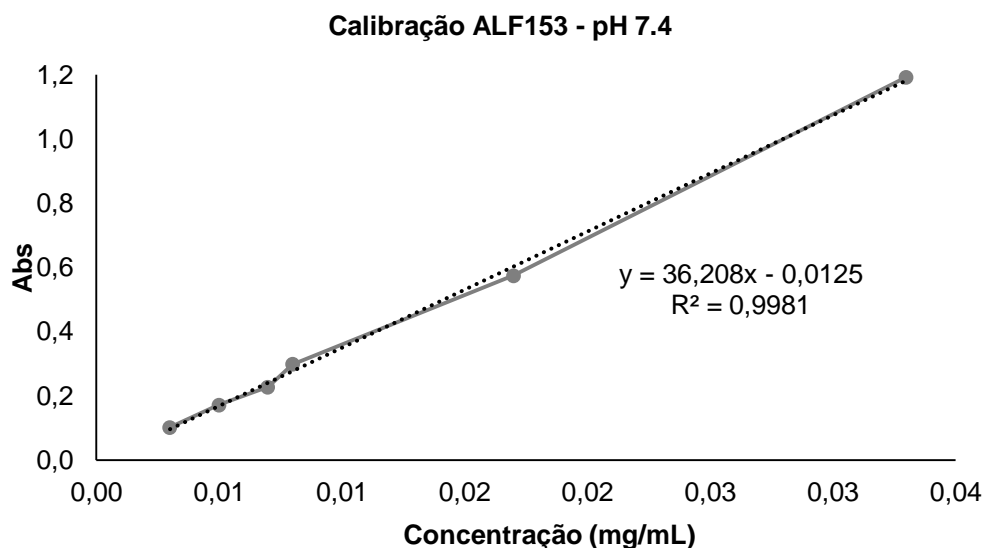


Figura 7.10: Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de libertação, *in vitro*, para o ALF153 nas NPs e para o ALF153 livre, usando como meio de diálise o PBS+2%DMSO (pH 7.4).

## 7.5 RETA DE CALIBRAÇÃO ALF157

### 7.5.1 Taxa de encapsulação

A reta de calibração para a taxa de encapsulação efetuou-se utilizando uma solução *stock* de 1mg/mL de ALF157 em água com 5% de DMSO. Para traçar a reta de calibração efetuaram-se diluições da solução *stock* e mediu-se a absorvância entre os 200-600nm. A reta obtida encontra-se representada na figura 7.11.

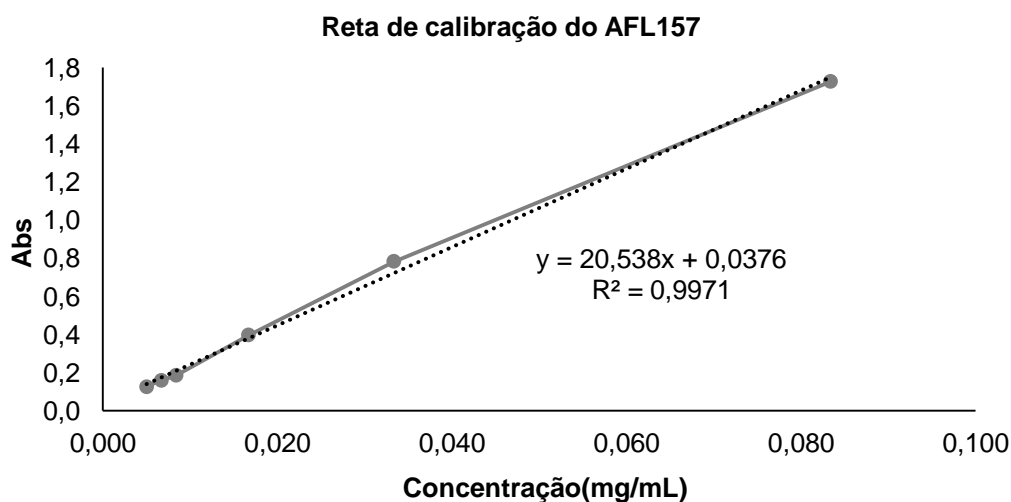
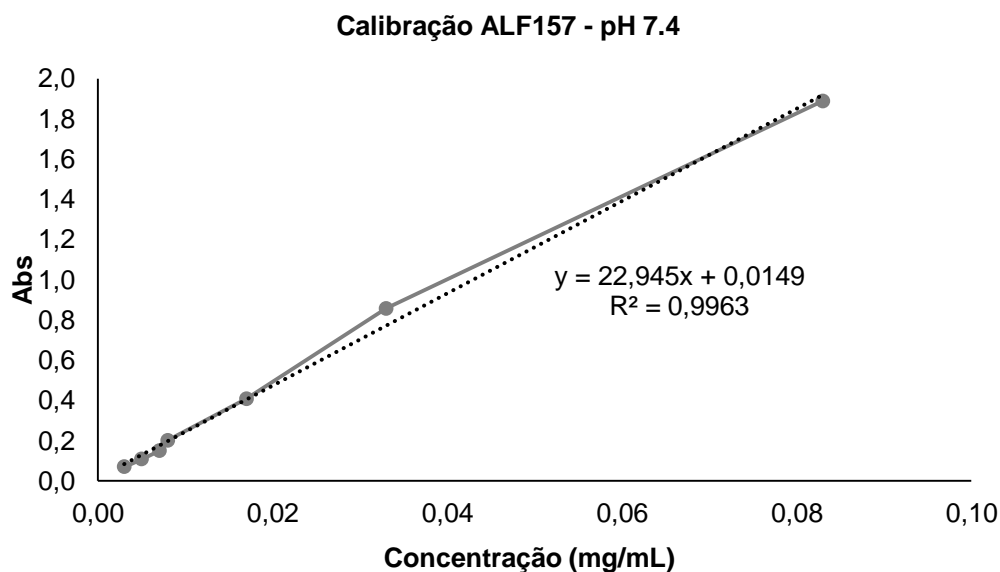


Figura 7.11: Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de encapsulação do ALF157 nas NPs.

### 7.5.2 Estudos de liberação *in vitro*

A reta de calibração do ALF157 para os estudos de liberação a pH 7.4 efetuou-se utilizando como solução mãe a solução preparada para os estudos de liberação do ALF157 livre. Para tal, efetuaram-se diluições a partir dessa solução e mediu-se a absorvância entre os 200-600nm, obtendo-se a reta representada na figura 7.12. Como branco utilizou-se uma solução de PBS com 2% de DMSO.



**Figura 7.12:** Representação gráfica da reta de calibração obtida para a determinação da taxa de liberação, *in vitro*, para o ALF157 nas NPs e para o ALF157 livre, usando como meio de diálise o PBS+2%DMSO (pH 7.4).

## 7.6 CINÉTICA DE LIBERTAÇÃO

Na tabela 7.1 estão representados os valores para os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e para as constantes da taxa de liberação ( $k$ ), obtidos através da aplicação de modelos matemáticos aos dados obtidos nos estudos de liberação *in vitro*.

**Tabela 7.1:** Valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) das constantes da taxa de libertação ( $k$ ), para a libertação dos CORMs, de acordo com os modelos estudados.

Composto	pH	Ordem zero		Primeira ordem		Hixcon-Crowell		Higuchi		Korsmeyer-Peppas	
		$R^2$	$k_0$	$R^2$	$k_1$	$R^2$	$k_{HC}$	$R^2$	$k_H$	$R^2$	$k_{KP}$
CORM-2	7.4	0.6464	2.99E-02	0.2207	2.29E-02	0.6464	8.96E-02	0.8062	1.84E-01	0.9293	3.38E+00
	1.6	0.7323	2.08E-01	0.4344	1.85E-01	0.7323	6.23E-01	0.7323	4.15E-01	0.9412	3.53E+00
	6.5	0.9243	1.39E-01	0.7447	2.25E-02	0.9538	1.48E+00	0.9632	7.86E-01	0.9689	3.78E+00
	5.0	0.9294	4.69E-02	0.7482	3.17E-02	0.9294	1.57E-01	0.8471	2.46E+00	0.9243	6,73E-01
ALF073	7.4	0.9711	8.68E-01	0.9666	7.57E-01	0.9711	2.89E-01	0.9711	4.34E-01	0.9884	4.62E+00
ALF153	7.4	0.4651	3.95E+00	0.8124	8.12E+00	0.8997	1.25E+01	0.7834	9.64E+00	0.9087	7.35E+01
ALF157	7.4	0.6756	2.48E+00	0.9574	5.39E+00	0.6756	8.28E-01	0.9110	1,70E-01	0.9646	3.02E+01

$k_0$  = constante de libertação de ordem zero;  $k_1$  = constante de libertação de primeira ordem;  $k_{HC}$  = constante de velocidade de Hixcon-Crowell;  $k_H$  = constante de dissolução de Higuchi;  $k_{KP}$  = constante de velocidade de libertação de fármacos de Korsmeyer-Peppas

